

N° d'ordre : 104/2016



جامعة السلطان مولاي سليمان
Université Sultan Moulay Slimane

UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal



Centre d'Etudes Doctorales « Sciences et Techniques »
Formation Doctorale « Ressources Naturelles, Environnement et Santé »

THESE

Présentée par

Mustapha BOUZAIID

Pour l'obtention du grade de

Doctorat

Spécialité : Industries Agricoles et Alimentaires

Contribution à l'utilisation des bactéries lactiques
dans la bio-conservation des aliments.

Soutenue le **17 / Décembre / 2016** devant le jury :

Pr. OUKANI El Hassan	Faculté des Sciences et Techniques de Settat	Président et rapporteur
Pr. BEN SALAH Mohamed	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal	Rapporteur
Pr. GAMOUH Ahmed	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal	Rapporteur
Pr. HASIB Aziz	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal	Directeur de thèse
Pr. ALAOUI Medaghri Abdelouahid	Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal	Examineur

Remerciements

Mes plus vifs remerciements vont d'abord à Monsieur le Président de l'Université Sultan Moulay Slimane et Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal. Qu'ils veuillent bien trouver ici mes vifs remerciements et mes profonds respects.

Je saisis cette occasion pour présenter mes vifs remerciements aux lecteurs attentifs de ce manuscrit les Professeurs: *Pr. Mohammed BENSALAH* , *Pr. Ahmed GAMOUH* et *Pr. El Hassan OUKANI*, et *Pr. Abdelouahid Medaghri ALAOUI* qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il me soit permis de leur exprimer ma reconnaissance et mon respect.

Mes pensées se dirigent tout d'abord au Professeur *Aziz HASIB*, pour avoir accepté de diriger ce travail avec beaucoup de patience et de présence. Qu'il soit remercié en premier pour sa grande disponibilité, son suivi continu, ses aides utiles, ses discussions fructueuses et ses conseils constructifs et précieux. La qualité de ses idées m'a permis d'atteindre la finalité de ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici mes vifs remerciements et mes profonds respects.

Je tiens à remercier *Pr. Abdelmajid Zyad*, responsable de cette formation Doctorale, *Pr. Khalid Habbari*, Vice Doyen Chargé de la Recherche Scientifique et *Pr. Said El Maliani*, Directeur du CED, à qui nous devons beaucoup, pour l'intérêt qu'ils portent au déroulement des activités de recherche au sein de la Faculté.

D'autre part, je transmets mes sincères remerciements au Pr. *Hassan Latrach*, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal pour le temps qu'il m'a accordé pour la révision de l'article et les conseils scientifiques dont il m'a fait bénéficier pendant la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les *Enseignants* et les *Administrateurs* de la FST de Béni Mellal qui ont contribué de près ou de loin a l'élaboration de ce travail.

AVANT PROPOS

Nom et prénom : BOUZAID Mustapha
Formation doctorale : Ressources Naturelles Environnement et Santé
Date d'inscription en thèse : Octobre 2015
Directeur de thèse : HASIB Aziz
Entité de recherche : Équipe Environnement et Valorisation des Agro-Ressources
Thème de recherche :

Contribution à l'utilisation des bactéries lactiques dans la bio-conservation des aliments.

1. Publications scientifiques :

- M. Bouzaid, R. Chatoui, H. Latrache, A. Hasib

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains isolated from camel meat and raw milk,
Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol.10, N°1, p:1-12;2016.

-M. Bouzaid, H. Moumen, A. Jaouad, A. Hasib

Contribution to the validation of heat treatment of pasteurization of the olives canned greens ,J.
Mater. Environ. Sci. 7 (y) (2016) xxx-yyy (accepté)
ISSN : 2028-2508CODEN: JMESC

2. Communications dans les manifestations scientifiques :

Y. El-Ouazzani, A. Bouli, A. Hasib, M. Bouzaid

Etude ethnobotanique de la flore médicinale dans le sud est du Maroc,

CISPHARM-2016, du 25 au 26 février 2016, Faculté des Sciences et Techniques, Béni-Mellal,
Maroc.

RESUME

Les bactériocines sont des peptides produits par les bactéries lactiques (BL) et ayant une activité antibactérienne. Sept souches de BL ont été isolées et identifiées par des méthodes physiologiques et biochimiques, à partir de lait de vache et de viande hachée de dromadaire. Cette étude a montré que ces souches appartiennent à quatre espèces différentes de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* : *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. yamanashiensis* et *L. salivarius*. Ces sept souches ont été évaluées pour leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de treize germes pathogènes et d'altération. Les résultats de cette étude ont montré que la souche *L. yamanashiensis*, isolée de la viande hachée de dromadaire, possède un pouvoir inhibiteur plus large que celui des autres souches lactiques. En effet, cette souche est capable d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens* et trois espèces de *Salmonella*.

MOTS CLES : lait cru de vache, viande de dromadaire, bactériocine, bactéries lactiques, germes pathogènes.

ABSTRACT

Bacteriocins are peptides produced by lactic acid bacteria and having antibacterial activity. Seven strains were isolated from cow milk and camel meat, then identified by physiological and biochemical methods. This study revealed four different species of lactic strains of *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. yamanashiensis* and *L. salivarius*. These seven strains were evaluated for their inhibitory effect toward 13 pathogen and spoilage microorganisms. The results obtained showed that the strain *L. yamanashiensis*, isolated from camel meat, has a greater inhibitory effect than other lactic strains. Indeed the antimicrobial principle of this strain is capable of inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens* and three species of *Salmonella*.

KEYS WORDS: raw milk, camel meat, bacteriocins, lactic acid bacteria, pathogens

ملخص

تعتبر Bactériocine مادة ذات طبيعة بروتينية و التي تنتجها بكتريا حمض اللبن و لها نشاط مضاد لبكتريا الضارة و المعفنة للمواد الغذائية

لقد تم عزل و تشخيص 7 سلالات من بكتريا حمض اللبن و المنتمية إلى وسطين هما مفروم لحم الجمل و حليب البقر. نتيجة الدراسة الفيزيولوجية و البيوكيميائية بينت إن هذه السلالات تنتمي إلى بكتريا حمض اللبن من جنس *Lactobacillus* و من أربعة أنواع التالية:

L.salivarius, L.yamanashiensis L.amylovorus, L.acidophilus

لقد تم دراسة قوة التثبيط لهذه السلالات ضد 13 بكتريا ضارة و بينت نتيجة هذه الدراسة أن السلالة *L.yamanashiensis*, المعزولة من مفروم لحم الجمل تتوفر على اكبر نشاط تثبيطي مقارنة مع نشاط السلالات اللبينية الأخرى, بحيث أن هذه السلالة تمكنت من الحد من نمو البكتريا الضارة التالية :

Proteus mirabilis ; Pseudomonas flouresence ; Staphylococcus aureus ;

Salmonella و لتلاثة خلايا من نوع *Citrobacter freundii*

كلمات المفاتيح : حليب البقر. مفروم لحم الجمل. بكتريا حمض اللبن. بكتريا ضارة. Bactériocine

Lite des tableaux:

Tableau 1 : Type de fermentation et produits majoritaires en fonction du genre de BL.....	15
Tableau 2 : Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines	23
<hr/>	
Tableau 3 : Quelques bactériocines produites par les BL.....	32
Tableau 4 : Classification des bactériocines	33
Tableau 5 : Application des bactériocines comme conservateurs alimentaires.....	42
Tableau 6 : Caractéristiques phénotypiques et physiologiques de sept souches du genre <i>Lactobacillus</i> isolées de la viande hachée de dromadaire et de lait cru de vache.....	50
Tableau 7 : Caractéristiques biochimiques des souches du genre <i>Lactobacillus</i>	51
Tableau 8 : Diamètre de la zone d'inhibition de sept bactéries lactiques (BL) vis-à-vis de certaines souches pathogènes par la méthode de diffusion sur milieu Hinton.....	54

Liste des figures

- Figure 1:** Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S..... .9
- Figure 2 :** Représentation schématique des deux voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques 15
- Figure 3 :** Modèle du système protéolytique chez *Lactococcus lactis*..... ..17
- Figure 4:** différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran.....19

Sommaire

INTRODUCTION	1
1 ^{ERE} PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. PRESENTATION GENERALE	5
2. HABITAT DES BACTERIES LACTIQUES	5
3. ORIGINE DES BACTERIES LACTIQUES	6
4. TAXONOMIE DES BACTERIES LACTIQUES	7
5. CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX GENRES DES BACTERIES LACTIQUES	10
5.1. <i>GENRE LACTOBACILLUS</i>	10
5.2. <i>GENRE LACTOCOCCUS</i>	10
5.3. <i>GENRE STREPTOCOCCUS</i>	11
5.4. <i>GENRE ENTEROCOCCUS</i>	11
5.5. <i>GENRES LEUCONOSTOC, OENOCOCCUS ET WEISSELLA</i>	11
5.6. <i>GENRES PEDIOCOCCUS ET TETRAGENOCOCCUS</i>	12
5.7. <i>GENRE BIFIDOBACTERIUM</i>	13
6. EXIGENCES NUTRITIONNELLES DES BACTERIES LACTIQUES	13
6.1. <i>METABOLISME DES CARBOHYDRATES</i>	13
6.2. <i>METABOLISME DE L'AZOTE</i>	16
6.3. <i>VITAMINES</i>	18
6.4. <i>MINERAUX</i>	18
6.5. <i>OXYGENE</i>	18
7. GENETIQUE DES BACTERIES LACTIQUES	18
8. IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES	19
8.1. <i>CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET STRUCTURAUX</i>	19

8.2. CARACTERES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES	20
8.3. CARACTERES IMMUNOLOGIQUES	20
9. ROLE ET ACTIVITE DES BACTERIES LACTIQUES	21
9.1 <i>ROLE TECHNOLOGIQUE</i>	21
9.1.1 Production d'arome	21
9.1.2 Production d'exopolysaccharides	21
9.1.3 Action probiotique	21
9.2. <i>ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES BACTERIES LACTIQUES</i>	22
9.2.1. La compétition nutritionnelle et pour l'espace	24
9.2.2. La production de métabolites antimicrobiens non peptidiques	25
9.2.2.1. Les acides organiques, effet du pH	25
9.2.2.2. Production de peroxyde d'hydrogène	28
9.2.2.3. Acides gras	28
9.2.2.4. Dioxyde de carbone (CO ₂)	29
9.2.2.5. Diacétyle	29
9.2.2.6. Acétaldéhyde	29
9.2.2.7. Reutérine	29
9.2.3. Production des bactériocines	30
9.2.3.1. Définition des bactériocines	30
9.2.3.2. Classification des bactériocines	33
9.2.3.3. Mode d'action des bactériocines	34
9.2.3.4. Production et conditionnement des bactériocines	35
9.2.3.5. Combinaison de différentes bactériocines	36
9.2.3.6. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents	36
9.2.3.7. Interactions entre les souches de bactéries lactiques	36
9.2.4. Utilisation des bactériocines en industrie agro-alimentaire	38
2^{IEME} PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE	43
1. INTRODUCTION	44
2. MATERIEL ET METHODES	46
2.1. <i>ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES</i>	46
2.2. <i>ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES SOUCHES DE BL</i>	46
2.2.1. Préparation de l'extrait bactériocinique	46
2.2.2. Activation des souches pathogènes	47

2.2.3. Préparation des suspensions	47
2.2.4. La diffusion en puits	47
<i>3. RESULTATS ET DISCUSSION</i>	49
<i>3.1. IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES</i>	49
<i>3.2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES BACTERIES LACTIQUES</i>	52
CONCLUSION GENERALE	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59
ANNEXES	70

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides, ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (Mozzi et *al.*, 2010).

Les ferments lactiques étaient constitués d'un mélange inconnu, non maîtrisé et variable, de plusieurs souches ou espèces de bactéries. Ils provenaient d'une fermentation naturelle dans le produit considéré. Une partie de ce produit fermenté était conservée, pour ensuite ensemercer les fermentations ultérieures. Actuellement, la production de ferments lactiques s'est développée au sein d'usines spécialisées, à partir de souches bactériennes isolées et sélectionnées (Beal et *al.*, 2008).

Par ailleurs, les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires, c'est pourquoi les antibiotiques ont été utilisés pour les éliminer. Ceci a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientées vers la recherche de substances naturelles entre autres les bactériocines des bactéries lactiques.

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables et nuisibles. En plus de l'effet protecteur de l'acide lactique, l'acide acétique, le di-acétyle et le peroxyde d'oxygène, la découverte des bactériocines a donné un élan pour le développement d'aliments de qualité sanitaire meilleure.

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques.

En diminuant la perte économique due à la contamination de produits alimentaires, la bioconservation pourrait remplacer l'utilisation de conservateurs chimiques et les traitements thermiques. Elle permettrait une conservation naturelle des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles, souvent perdues sous l'effet des agents chimiques ou de la chaleur (Gálvez*et al.*, 2007, Settanni et Corsetti, 2008). Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (Dortu et Thonart, 2009).

Ces dernières années, l'intérêt de l'emploi de la bactériocine et/ou tout autre BL productrice de substances inhibitrices pour des applications de biopréservation a suscité beaucoup de recherches

(Schillinger et Lucke, 1989; Budde et *al.*, 2003; Jacobsen et *al.*, 2003; Vermeiren et *al.*, 2004; Guessas, 2007 et Saidi, 2007)

L'objectif de cette thèse est d'étudier la possibilité d'utiliser des bactéries lactiques d'origine alimentaire pour la bio préservation des aliments. Effet, la partie bibliographique consistera en une étude portant sur les bactéries lactiques et les principales rôles de ces bactéries et leurs composés antimicrobiens. Alors que le travail expérimental s'inscrit dans le cadre de la recherche de substances bioactives produites par les bactéries lactiques essentiellement à partir de biotope peu exploré comme la viande de dromadaire.

Ainsi l'objectif de ce travail est d'isoler des bactéries lactiques à partir la viande hachée de dromadaire et tester leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des bactéries pathogènes.

1^{ère} Partie :
Etude bibliographique

1. Présentation générale

Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets qui sont en générale aérotolérantes (Larpent, 1997). Cependant certaines espèces habitant par exemple le tube digestif des animaux sont anaérobies strictes, même en présence d'O₂, elles sont incapables de réaliser la phosphorylation oxydative. Elles sont Gram-positif; généralement immobiles et asporulées. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni Cytochrome oxydase. En plus de cela ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (Dellaglio et al., 1994)

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes (Labioui et al., 2005). Ce sont des cellules vivantes, autonomes et procaryotes (Doleyres, 2002), dont le caractère commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides (Labioui et al., 2005).

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre important de ses aliments. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (Eufic, 1999).

Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Trias et al., 2008). Néanmoins, certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins, 1993).

2. Habitat des bactéries lactique

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou

l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Klein et al., 1998).

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 (Douault et Corthier, 2000) et ont été également retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout (Holzapfel et al., 1996. Cité par Givry, 2006).

3. Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Quiberoni et al., 2001). De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni et al., 2001). D'autres études montrent que certaines bactéries lactiques, comme *Lb. lactis*, sont en voie d'acquérir une chaîne respiratoire (Duwat et al., 2001)

Les bactéries lactiques ont été isolées dans de nombreux milieux naturels végétaux animaux et humains ; certaines espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne semblent guère se retrouver ailleurs que dans leur habitat naturel. Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents de point de vue physico-chimique et biologique (De Roissard et Luquet, 1994).

Selon Desmazeaud (1992), les espèces du genre *Streptococcus* ; *Lactococcus* et *Leuconostoc* et *Pediococcus* se rencontrent plutôt chez les hommes ainsi que chez les animaux. Dans le domaine laitier. Elles existent en quantité considérable. Les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature ; par exemple : on les trouve chez les végétaux où elles assurent l'acidification de l'ensilage ; on les trouve aussi dans les intestins des animaux et de l'Homme. Elles sont également isolées des cavités naturelles d'organismes (cavités buccales et cavités vaginales) (De Roissard et Luquet, 1985).

4. Taxonomie des bactéries lactiques

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007).

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, actobacilles, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pot,

2008). Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques (Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des sucres particulière. Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (figure 1) (Stiles et Holzopfel, 1997; Pilet et al., 2005).

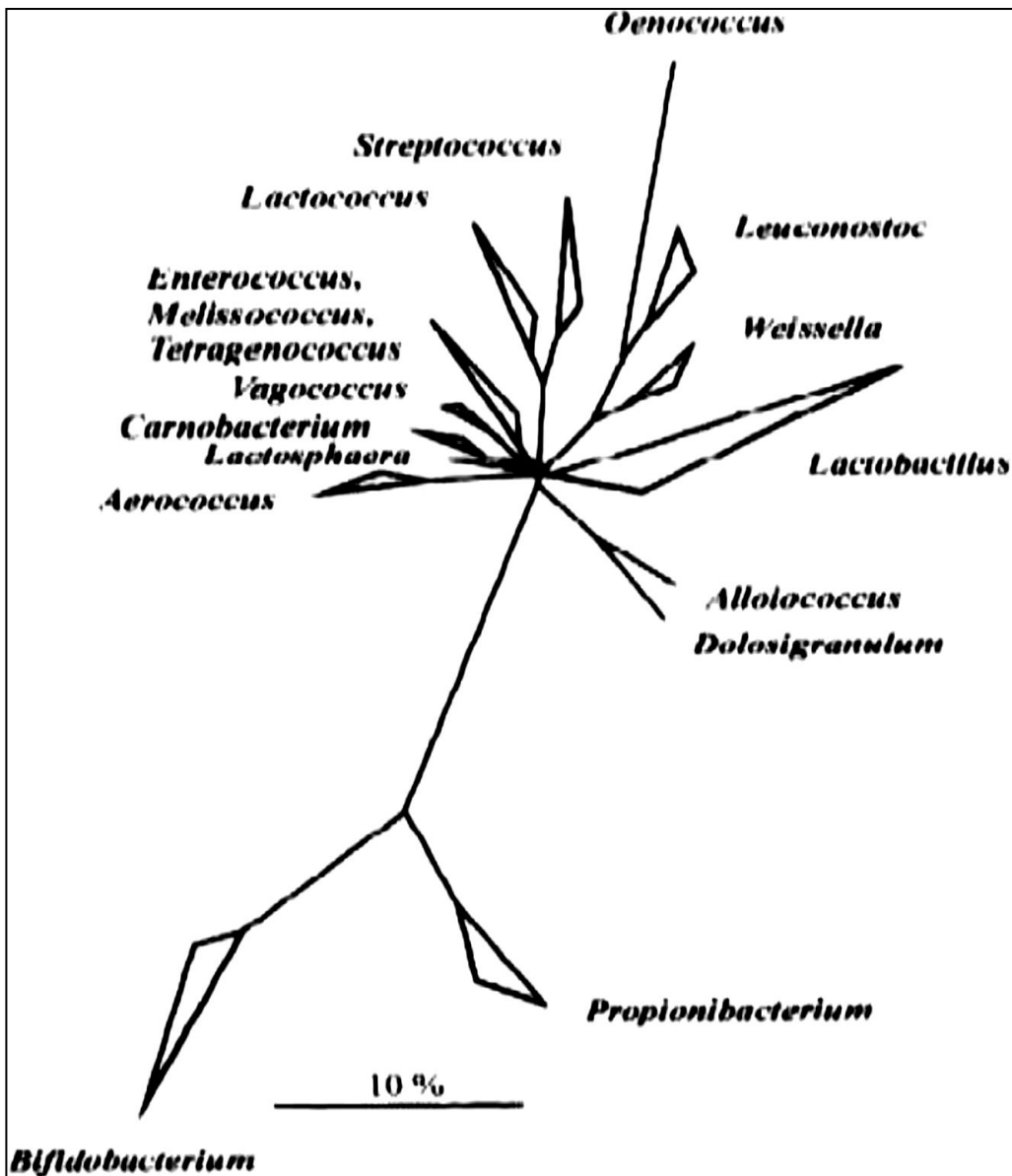


Figure 1: Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

5. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

5.1. Genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994).

5.2. Genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet *et al.*, 2005). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C.

Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

5.3. Genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet et *al.*, 2005).

5.4. Genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type α et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et *al.*, 2007).

5.5. Genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol.

Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostocs principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

5.6. Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

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

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

5.7. Genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C (Pilet et *al.*, 2005).

Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et *al.*, 2004 ; Pilet et *al.*, 2005 ; HO et *al.*, 2007).

6. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Si les bactéries lactiques sont considérées comme un des groupes bactériens les plus exigeants du point de vue nutritionnelle, c'est parce qu'elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligo-éléments dont le rôle de coenzyme a été déjà développé (Luquet, 1986).

6.1. Métabolisme des carbohydrates

Deux systèmes de transports actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Kandler, 1983 ; Corrieu et Luquet, 2008). Par exemple, le lactose est pris en charge par une perméase

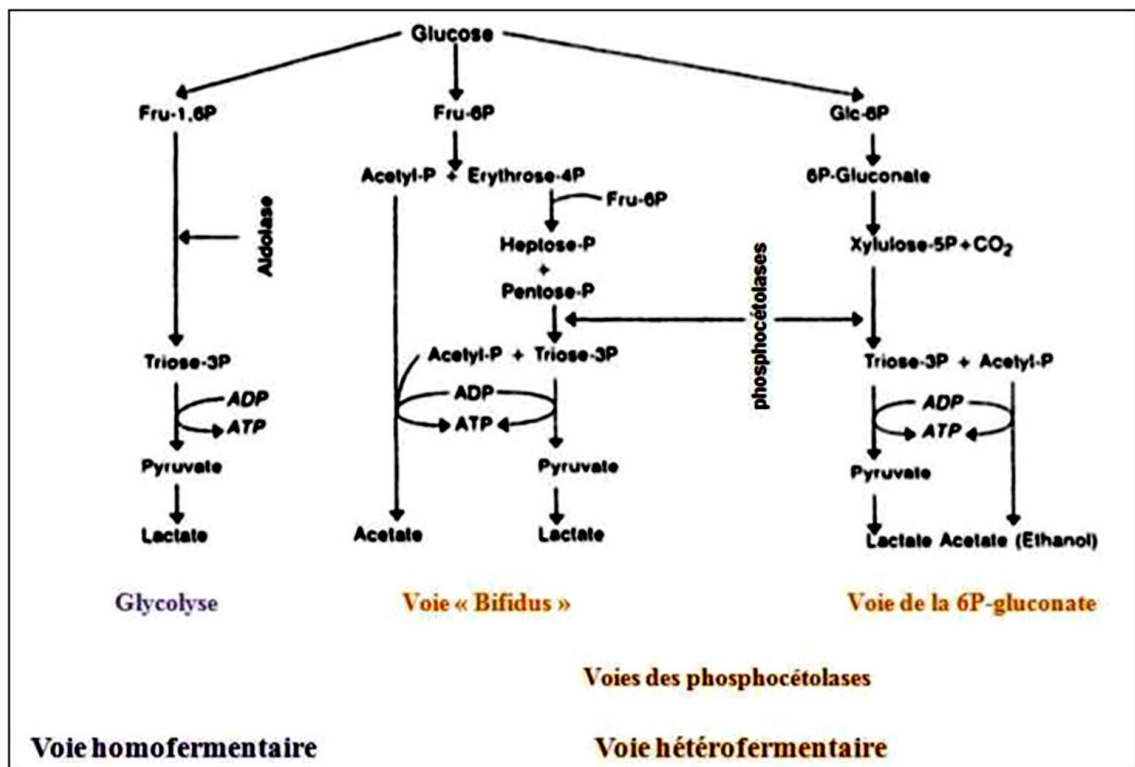
spécifique et il est divisé par une β -galactosidase chez la plupart des Lactobacilles. Le D-galactose résultant est converti en glucose-6-phosphate qui sera ensuite fermenté selon les voies décrites Figure 2 (Kandler, 1983).

Selon leurs métabolismes, les bactéries lactiques sont homofermentaires ou hétérofermentaires. La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques (principalement des glucides) où un donneur d'électron (NADH) cède ses électrons à un accepteur exogène, le pyruvate (Reis *et al.*, 2012). Les espèces homofermentaires, telles que *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et quelques *Lactobacillus*, produisent majoritairement de l'acide lactique par fermentation des sucres (hexoses). Suivant les microorganismes, l'isomère optique formé est soit l'acide lactique D (-), soit l'acide lactique L (+), soit la forme racémique (D+L). Quant aux espèces hétérofermentaires, telles que *Leuconostoc* et *Weissella*, elles produisent, outre l'acide lactique, plusieurs métabolites tels que d'autres acides organiques (acétate), de l'éthanol, de l'acétoïne, du dioxyde de carbone et des composés aromatiques (tels que le diacétyl, l'acétaldéhyde) (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Trias, 2008) (Tableau 1).

La fermentation homolactique suit la voie de la glycolyse ou encore appelée Embden-Meyerhof-Parnas. La voie de la 6-phosphogluconate qui donne du dioxyde de carbone (CO₂), du lactate, de l'acétate et dans certains cas de l'éthanol, est utilisée par les microorganismes dits hétérofermentaires, à l'exception des bifidobactéries qui utilisent la voie « Bifidus » (**Figure 2**).

Tableau 1 : Type de fermentation et produits majoritaires en fonction du genre de BL (Kandler, 1983 ; Corrieu et Luquet, 2008).

Genre	Voie fermentaire	Produits majoritaires (ratio molaire)	Configuration du lactate produit
<i>Streptococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	L (+)
<i>Lactococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	L (+)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	DL, L (+)
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentaire	Lactate	D(-), L(+), DL
<i>Leuconostoc</i>	Hétérofermentaire	Lactate : Acétate : CO ₂ (1:1:1)	D(-)
<i>Bifidobacterium</i>	Hétérofermentaire	Lactate : Acétate (2 : 3)	L(+)



ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate

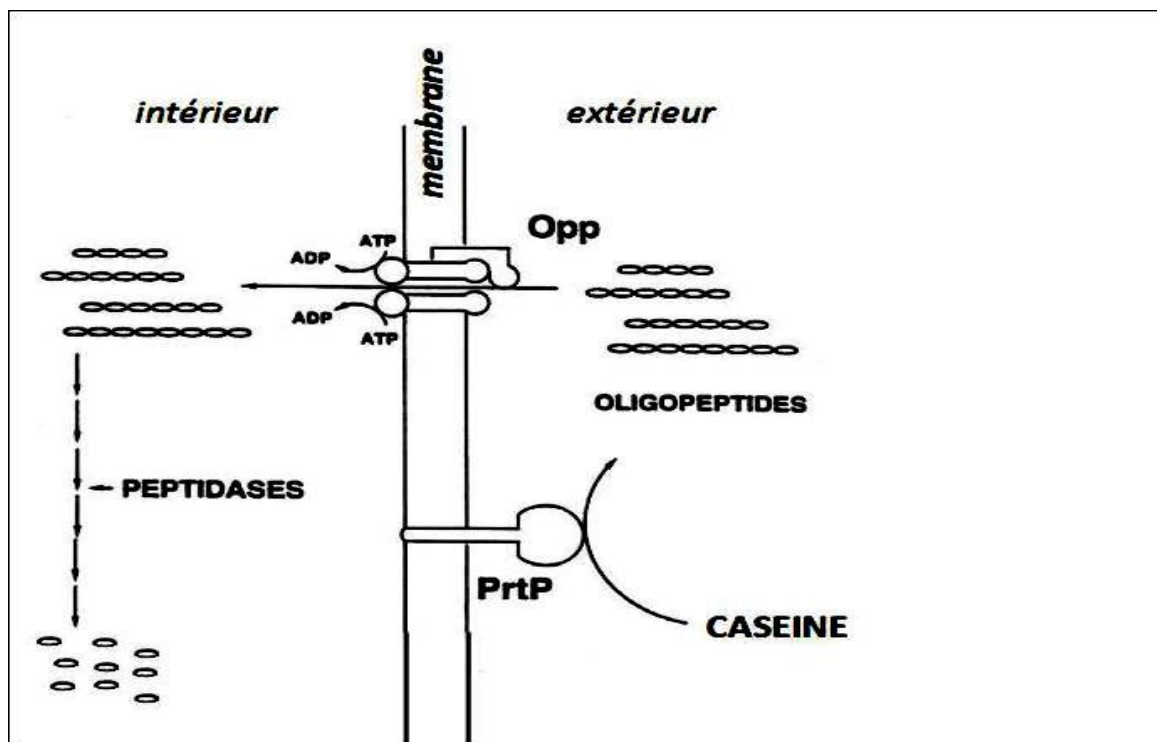
Figure 2 : Représentation schématique des deux voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (d'après Kandler, 1983).

6.2. Métabolisme de l'azote

Hugenholtz et Kleerebezem ont publié en 1999 une revue concernant les données disponibles sur le métabolisme des BL et notamment le métabolisme de l'azote. Les BL forment la flore bactérienne principale des aliments fermentés, elles ont un mécanisme intrinsèque pour la métabolisation des protéines (notamment alimentaires). Cette activité protéolytique apporte aux cellules de BL les acides aminés essentiels pour leur croissance et donc par conséquent, ces bactéries ont des capacités limitées pour la synthèse des acides aminés à partir de source d'azote inorganiques (Salminen et Von Wright, 2009). Elles restent donc dépendantes des acides aminés pré-formés présents dans le milieu de culture comme sources d'azote. Néanmoins des variations existent entre les souches (Salminen et Von Wright, 2009) :

- certaines souches de *L. lactis* subsp. *lactis* sont capables de synthétiser la plupart des acides aminés dont elles ont besoin,
- les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* et *Lb. helveticus* ont besoin d'une quinzaine d'acides aminés.

Leur croissance dans un milieu de culture minimum est généralement faible et il est clair que les BL se sont adaptées à des environnements riches en développant des systèmes pour exploiter efficacement les sources d'azote présentes. Le système le plus étudié est le système des BL laitières, en particulier celui de *L. lactis*, pour le développement des technologies fermentaires laitières. La protéolyse est le mécanisme essentiel qui permet la croissance des BL dans le lait (**Figure 3**). Les protéases membranaires (PrtP) hydrolysent les protéines en oligopeptides qui entrent à l'intérieur de la cellule grâce à des transporteurs d'oligopeptides (Opp). Le système Opp accepte des oligopeptides de plus de 18 résidus (Detmers *et al.*, 1998). Une fois à l'intérieur, des peptidases coupent les oligopeptides en acides aminés.



Opp : transporteur d'oligopeptide ; PrtP : protéase membranaire

Figure 3 : Modèle du système protéolytique chez *Lactococcus lactis* (d'après Salminen et VonWright, 2009).

Bruinenberg *et al.*, en 1992, ont montré une augmentation du taux de croissance de *L. lactis* dans le lait pour des souches où une surproduction de protéase membranaire avait été induite. Il a aussi été montré que dans l'ensemble du processus de dégradation des protéines en peptides puis en acides aminés libres, l'absorption des peptides de taille importante du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule, dictée par le transporteur d'oligopeptides (Opp), est une étape cruciale dans la croissance de *L. lactis* dans le lait. Kunji *et al.*, en 1995, n'ont pas pu faire se développer des mutants Opp-négatif dans un milieu de culture où la caséine était la seule source d'acides aminés. En effet, Juillard *et al.*, en 1995, ont analysé les peptides dans le lait pendant une croissance de lactocoques et ont montré que les oligopeptides acceptés par le système de transport représentaient 98 % de la source d'azote utilisé par les cellules.

La transposition de ce système à d'autres BL que *L. lactis* ne peut pas encore être énoncé, les travaux sont encore trop rares. Néanmoins, lorsqu'ils ont été identifiés pour d'autres souches, ces systèmes protéolytiques sont identiques à celui de *L. lactis* (Salminen et Von Wright, 2009). Par exemple, le génome de *Lb. plantarum* contient tous les gènes (dont les gènes codant pour le système Opp (transporteur

d'oligopeptides)) pour mettre en place la dégradation de protéines (Salminen et Von Wright, 2009).

6.3. vitamines

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle irremplaçable de coenzyme. Les bactéries lactiques sont, à quelques exceptions près, incapables de synthétiser des vitamines (Desmazaud et De Roissart, 1994), d'où l'importance d'un apport exogène de vitamines au milieu de culture (Cocaign-Bousquet et *al.*, 1995).

6.4. Minéraux

La nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (Novel, 1993).

Du point de vue transport, le fer est un élément important puisqu'il a des affinités pour un grand nombre de molécules chelatrices. Il augmente la croissance et la production d'acide lactique pour les lactocoques et une carence en cet élément donne lieu à une diminution de ce même acide (Boyaval, 1989).

Le potassium, quant à lui, est un cofacteur pour plusieurs enzymes bactériennes et un niveau élevé de K⁺ dans le cytoplasme est requis pour la synthèse protéique. De plus, le système du K apparaît être très important pour contrôler le pH cytoplasmique (Desmazaud, 1983).

6.5. Oxygène

Les bactéries lactiques sont communément appelées micro aérophiles. Ainsi, elles tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs en ce gaz peuvent leur être néfaste. La relation des bactéries lactiques avec l'oxygène a probablement un lien avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit dans la cellule en présence d'air. Il faut éliminer le H₂O₂, car son accumulation devient toxique (Vignola, 2002).

7. Génétique des bactéries lactiques

Le matériel génétique des bactéries lactiques est organisé en deux structures: le chromosome, long filament d'ADN très replié sur lui-même, et les plasmides, petites

molécules circulaires d'ADN indépendantes du chromosome, pouvant se répliquer de façon autonome. Les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactérie dans les conditions de milieu défavorables (température élevée, privation nutritionnelles) ou éliminés par des traitements chimiques.

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

D'autres caractères technologiques sont également codés par des gènes portés par des plasmides : la capacité à utiliser le lactose, le métabolisme de précurseurs d'arômes, la production de la nisine chez certaines souches, des résistances aux bactériophages (Stackebrandt et Teuber, 1988 et Kandler et Weiss, 1986).

8. Identification des bactéries lactiques

8.1. Caractères morphologiques et structuraux

La forme : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espace et du genre bactérien (coques ou bâtonnets) (Prevost, 2009) (figure 4)

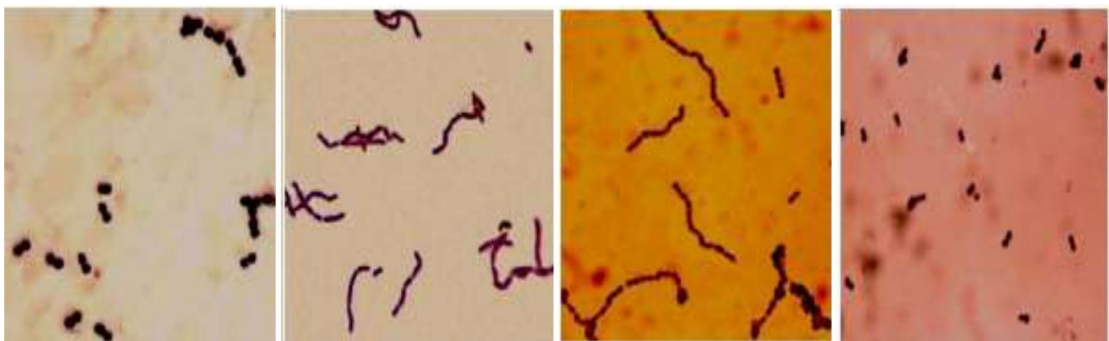


Figure 4: différentes formes microscopiques de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par Saidi (2007). De gauche à droite, Diplocoques (*Leuconostoc* sp.), (*Lactobacillus* sp.), streptocoques et diplocoques (*Lactococcus lactis* sp.) (Grossissement x 1000).

- Le diamètre cellulaire : est un caractère plus stable que la longueur cellulaire.
- La mobilité: est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas où elles possèdent des flagelles péritriches.
- La sporulation: toutes les bactéries lactiques sont non sporulées.
- L'analyse de ces composés cellulaires est entrain de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries.
- Les recherches chimio taxonomiques réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifiques.

La présence d'inclusions cellulaires, corpuscules métachromatiques ou de volutine, est un caractère distinctif de certaines espèces du genre *Lactobacillus* homofermentaires strict (Renouf, 2006).

8.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Regroupent la quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, production de gaz et d'arome, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes valeurs de pH (Luquet et De Roissard, 1994).

8.3. Caractères immunologiques

La réaction immunologique se traduit par l'agglutination des cellules bactériennes ou par la précipitation à l'interface antigène-antisérum (De Roissard et Luquet 1985).

La sérologie a été utilisée pour la classification et l'identification des Streptocoques, depuis que Lancefield (1933), propose les premiers groupements. Les groupes sérologiques comme le cas des streptocoques lactiques qui sont rangés dans le groupe sérologique N.

9. Activités des bactéries lactiques

9.1. Rôle technologique des B.L.

9.1.1. Production d'arômes

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : L'acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit *et al.*, 2005 ; Cholet, 2006).

9.1.2. Production d'exopolysaccharides

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini (Dupont, 1998).

En général, la présence de polysaccharides dans des produits fermentés, tels les yogourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (Desmazaud, 1983).

9.1.3. Action probiotique

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs « pro » et « bios » et signifie littéralement « en faveur de la vie » (Roberfroid, 2002). Un probiotique est un microorganisme vivant qui est lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante il exerce un effet positif sur la santé (Dacosta, 2001).

Les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées en alimentation humaine et animale pour leurs effets probiotiques (Tableau 3). Parmi ces effets on peut citer :

➤ Les bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur sur le développement et la synthèse des toxines par autres microorganismes pathogènes (Karovicova et Kohajdova, 2003) ;

➤ Les bactéries lactiques possèdent des propriétés antitumorales qui pourraient être due à :

- L'inactivation ou l'inhibition des composés carcinogènes dans le tractus gastro-intestinal.
- La réduction des activités enzymatiques des bactéries intestinales telle que la β .glucoronidase, l'azoréductase et la nitroréductase (Chafai ,2006).

➤ La prévention et traitement des diarrhées dues aux infections gastro-intestinales (Lyons, 2000)

9.2. Activité antimicrobienne des B.L.

Les bactéries lactiques, utilisées habituellement en tant que ferments pour développer certaines caractéristiques organoleptiques, peuvent également avoir un rôle comme agent de préservation des aliments. Le pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques peut être attribué à divers facteurs :

- la compétition nutritionnelle et pour l'espace ;
- la production d'un ensemble de métabolites possédant des propriétés antimicrobiennes.

Ces métabolites sont des acides organiques (principalement l'acide lactique), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle (le 2,3-butanedione), la reutérine et les bactériocines (Ammor *et al.*, 2006 ; Dalié *et al.*, 2010) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Suskovic *et al.*, 2010).

Composés antimicrobiens	Souches productrices	Spectre antimicrobien
Acide lactique	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram +/-
Acide acétique	Bactéries lactiques hétérofermentaires	Levures Bactéries à Gram +/-
Diacétyle	<i>Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Pediococcus</i>	Levures Bactéries à Gram +/-
Peroxyde d'hydrogène	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram +/-
Dioxyde de carbone	Bactéries lactiques hétérofermentaires	La plupart des groupes taxonomiques de microorganismes
Reutéline	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Champignons, Protozoaires Bactéries à Gram +/-

9.2.1. La compétition nutritionnelle et pour l'espace

Les bactéries lactiques peuvent inhiber la multiplication de certains microorganismes d'altération et/ou pathogènes par leur propre présence. En effet, il s'agit du phénomène de compétition nutritionnelle et pour l'espace vis-à-vis d'autres espèces. Du fait de leurs importantes exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques envahissent complètement le milieu. Elles limitent alors la multiplication des autres colonisateurs (Castellano *et al.*, 2008). De plus, les cellules d'une même espèce possèdent des systèmes de communication (Gram *et al.*, 2002). Lorsqu'une certaine densité cellulaire est atteinte (système de « Quorum Sensing »), des signaux sont envoyés d'une cellule à l'autre pour réguler l'expression de certains gènes et orienter le métabolisme :

- pour la plupart des bactéries à gram positif, ce sont des peptides qui servent de signaux moléculaires ;
- pour la plupart des bactéries à gram négatif, les signaux les plus étudiés sont les lactones N-acyl homosérine.

Dans un environnement homogène, les populations bactériennes sont capables de se développer sans entrave jusqu'à un déficit global des composants clés du métabolisme ou jusqu'à atteindre une concentration seuil en composés toxiques. Dans le cas de co-culture, la compétition pour les nutriments sélectionne les microorganismes les plus capables de récupérer les composés limitants (minéraux, acides aminés, sucres) (Gram *et al.*, 2002). Par exemple, le fer est essentiel pour la plupart des microorganismes et est utilisé pour la « respiration bactérienne » (comme transporteur d'électron). Les microorganismes ayant développé des systèmes spécifiques au fer (sidérophores qui sont des chélateurs du fer sécrétés par les cellules) (ex famille *Pseudomonadaceae*) sont capables d'inhiber des microorganismes dépourvus de cette capacité par réduction de la quantité de fer disponible dans l'environnement (Gram *et al.*, 2002). Ce type d'inhibition par compétition pour les nutriments essentiels a aussi été mis en évidence pour les BL et *Listeria* spp. (Nilsson *et al.*, 1999 ; Buchanan et Bagi, 1997) et, pour les BL et *Staphylococcus aureus*. Par

exemple, *Lactococcus lactis* spp. *diacetylactis* peut métaboliser les vitamines très rapidement abaissant dans le cas d'une co-culture avec *S. aureus* la quantité disponible pour cette dernière souche (Charlier *et al.*, 2009). L'élimination d'un organisme particulier par une flore envahissante est appelée l'effet Jameson (Gram *et al.*, 2002).

Les environnements hétérogènes présentent d'autres challenges. En effet, l'activité métabolique crée un gradient et la croissance des cellules dépend alors de leurs localisations (Malakar *et al.*, 2003). Les cellules ont une taille entre 1 et 2 μm . La diffusion joue donc un rôle important pour le transport des substrats à l'intérieur de la cellule et l'évacuation des déchets à l'extérieur, i.e. un effet de limitation dû au transport. C'est l'inoculum initial qui détermine la distribution spatiale des cellules. Si la distance entre BL et la souche cible est au-dessus d'une certaine valeur, les interactions inter-colonies seront retardées et la souche cible pourra se développer sans entrave dans ces zones clairsemées (Malakar *et al.*, 2003).

En plus des phénomènes de compétition nutritionnelle et pour l'espace, l'inhibition d'une souche par une autre est souvent associée à une molécule produite. Dans le cas des BL inhibitrices, un large spectre de molécules est produit : acides organiques (principalement l'acide lactique), reutérine, peroxyde d'hydrogène, dioxyde de carbone, diacétyle (le 2,3-butanedione) et bactériocines.

9.2.2. La production de métabolites antimicrobiens non peptidiques

9.2.2.1. Les acides organiques, effet du pH

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 (Vignola, 2002). Les principaux acides produits sont l'acide lactique ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) et l'acide acétique ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) (Ammor *et al.*, 2006 ; Dalié *et al.*, 2010). Breidt et Fleming (1998) ont reporté que le pH était le premier facteur limitant la croissance de *L. monocytogenes* dans une co-culture avec *Lactococcus lactis*.

Les effets d'un stress acide sur la physiologie bactérienne ne sont pas connus en détail. Néanmoins il a été établi que les acides (sous leur forme non-dissociée) diffusent passivement à travers la membrane de la souche cible. Après leur entrée dans le cytoplasme où le pH est supérieur, ils se dissocient en protons et dérivés chargés auxquels la membrane est imperméable (Charlier *et al.*, 2009 ; Suskovic *et al.*, 2010). L'accumulation intracellulaire des protons abaisse le pH intracellulaire et affecte ainsi la force proton motrice qui est une source d'énergie pour de nombreux transports transmembranaires. Toute l'énergie disponible est alors utilisée pour dé-acidifier le cytoplasme en créant un gradient de protons au travers de la membrane cytoplasmique et la croissance bactérienne est alors fortement réduite (Charlier *et al.*, 2009). L'acidification interne peut aussi réduire l'activité des enzymes sensibles au pH acide, endommager des protéines et l'ADN. Enfin, l'accumulation dans le cytoplasme des dérivés anioniques des acides organiques dissociés peut avoir un effet néfaste sur la physiologie cellulaire par des interactions chelatantes avec des éléments essentiels (Van de Guchte *et al.*, 2002 ; Dalié *et al.*, 2010 ; Reis *et al.*, 2012).

L'acide lactique à 5 000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,5 %) inhibe la croissance de *L. monocytogenes* (Oh et Marshall, 1993). L'acide acétique a, quant à lui, un effet bactériostatique dès 0,2 % et un effet bactéricide à 0,3 % contre des bactéries à Gram positif lors d'une addition dans un aliment (Reis *et al.*, 2012). Néanmoins, cette activité dépend du pH et est plus prononcée à un pH faible en-dessous de 4,5.

Certaines bactéries lactiques hétérofermentaires dites propioniques sont capables de convertir le lactate en propionate et acétate accompagné d'une production de CO_2 . Même si cette production d'acide propionique est à l'état de traces, l'effet inhibiteur a été démontré surtout contre la croissance des champignons et moisissures (Reis *et al.*, 2012). L'acide propionique interagit avec la membrane cellulaire pour neutraliser le gradient électrochimique de protons, mais son effet est souvent dépendant de la diminution du pH engendré par la production d'acide lactique.

La plupart des BL possèdent un système de Tolérance à l'Acide (TA) (« Acid Tolerance Response ») qui leur permet de survivre et de continuer à faire fonctionner

leur métabolisme (Van de Guchte *et al.*, 2002). De Angelis et Gobbetti, 2004, et Van de Guchte *et al.*, 2002, ont décrit les mécanismes identifiés, respectivement, chez les lactobacilles probiotiques et plus généralement chez l'ensemble des bactéries lactiques. À l'exception de quelques espèces des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus*, les BL ont un pH optimal de croissance compris entre 5 et 9. La réponse de TA se met en place progressivement lors de la croissance des LAB suivant deux étapes (Van de Guchte *et al.*, 2002) :

- Pendant la phase logarithmique de croissance, les mécanismes commencent à être induit par l'exposition à un pH acide non létal ;
- Après l'entrée en phase stationnaire, la réponse de TA est maximale résultant de l'induction d'une réponse général au stress.

Cette adaptation progressive à des pH acides permet une meilleure survie dans des conditions extrêmes. Des cellules de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* adaptées 30 min à pH = 4,75 vont être approximativement 250 fois plus résistantes à un stress acide létal (30 min à pH = 3,6) que les cellules non adaptées (De Angelis et Gobbetti, 2004).

Plusieurs mécanismes régulent l'homéostasie du pH interne. Le mécanisme « transport de cation » lié à l'ATPase est le plus important chez les bactéries fermentatives (De Angelis et Gobbetti, 2004). Cette enzyme a été identifiée par exemple chez *Lactobacillus casei* et *plantarum* et son activité optimale a lieu à des pH entre 5,0 et 5,5. La voie de l'arginine déiminase (ADI) est un autre mécanisme de réponse à un stress acide qui peut être cité. La réponse de TA semble être liée à la modification de la synthèse de protéines, induite par des protéines de choc acide. Les études de la réponse de TA des lactobacilles en électrophorèse deux dimensions a révélé l'induction d'un grand nombre de protéines de choc acide : 21 pour *Lactobacillus collinoides*, 15 pour *Lactobacillus sanfranciscensis* et plus de 30 pour *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (De Angelis et Gobbetti, 2004).

9.2.2.2. Production de peroxyde d'hydrogène

La production et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène créent un environnement toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé. Son accumulation est inhibitrice vis-à-vis des souches qui génèrent de peroxyde mais aussi vis-à-vis d'autres microorganismes (De Roissart et Luquet, 1985).

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O_2) en super oxyde excité (O_2^-), en peroxyde (H_2O_2) ou en eau (H_2O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Condon, 1987). L'effet antimicrobien de H_2O_2 peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydryliques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides de membrane; de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane (Kong et Davison, 1980). H_2O_2 peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O_2^-) et radicaux d'hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN (Byczkowski et Gessner, 1988).

9.2.2.3. Acides gras

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté (Rao et *al.*, 1984) et des saucisses sèches (Sanz et *al.*, 1988).

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

9.2.2.4. Dioxyde de carbone (CO₂)

Il est principalement produit par les BL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO₂ peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO₂ dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Eklund, 1984).

Le CO₂ peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram- (Farber, 1991 et Hotchkiss et *al.*, 1999). Le degré d'inhibition par le CO₂ varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO₂ de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% (Wagner et Moberg, 1989), et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

9.2.2.5. Diacétyl

Il est produit par des souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* par la fermentation du citrate (Lindgren et Dobrogosz, 1990 et Cogan et Hill, 1993). Il est responsable des quelques autres produits laitiers fermentés. Les niveaux sensoriels acceptables du diacétyl sont de 2 à 7 µg/ml (Earnshaw, 1992)

Beaucoup de bactéries lactiques comprenant des souches de *Leuconostoc*, de *Lactococcus*, de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyl bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (Cogan, 1986). Son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée.

Cependant, le diacétyl peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens (Jay, 1992) et contribuer aux systèmes combinés de conservation en nourritures fermentées.

9.2.2.6. Acétaldéhyde

Chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive

la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'E. Coli dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991). Les quantités d'acétaldéhyde produites par les lactocoques oscillent entre 2,60 et 6,50 mg/ml (Bottazzi et Dellaglio, 1967). La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (Kulshrestha et Marth, 1974).

9.2.2.7.Reutéline

La reutéline est produite par *Lactobacilles reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux (Axelsson et *al.*, 1989).

La reutéline montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram+ et à Gram-. Les organismes de détérioration sensibles à la reutéline comprennent Salmonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus, Listeria, Candida, et Trypanosoma (Axelsson et *al.*, 1989)

9.2.3. Production des bactériocines

9.2.3.1. Définition des bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram⁺.

Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram⁻ n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram⁻ ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Smulders *et al.*, 1986 et Earnshaw, 1992). Cependant, de nombreux travaux ont identifié diverses bactériocines dont l'activité antimicrobienne a été prouvée, mais qui n'ont pour l'instant pas obtenu l'approbation de la part des autorités sanitaires (Deegan *et al.*, 2006) (**Tableau 3**)

Tableau 3 : Quelques bactériocines produites par les BL (Charlieret *al.*, 2009 ; Reiset *al.*,2012).

Genres	Espèces	Bactériocines	Souches cibles
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> WHE 81 <i>E. faecalis</i> A-48-32	Enterocine A et B Enterocine AS-48	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> AA11, DSM20079 <i>L. casei</i> <i>L. sakei</i> <i>L. plantarum</i> KLDS1.0391	Acidocine D20079 Lactocine 705 Sakacine Plantaricine MG	<i>Salmonella shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454 <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> <i>L. lactis</i> <i>L. lactis</i> MG1614 <i>L. lactis</i> <i>L. lactis</i>	Nisine A Nisine Z Lacticine 481 Enterocin A Lacticine 3147 Lactococcine A, B et M	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. <i>Listeria innocua</i> <i>Clostridium</i> <i>tyrobutyricum</i> <i>L. monocytogenes</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. gelidum</i> <i>L. mesenteroides</i>	Leucocin A Mesentericin Y105	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. monocytogenes</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilacti</i>	Pediocin A Pediocine AcH (PA-1)	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Listeria</i> sp., <i>Clostridium</i> sp.

9.2.3.2. Classification des bactériocines

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

Tableau 4 : Classification des bactériocines (Reiset *al.*,2012).

Classes	Caractéristiques principales	Stabilité thermique	Exemples
Classe I Lantibiotiques	-cycles thioester dans la séquence -poids moléculaire < 5 kDa	Stable	Nisin Lactacine 481 Carnocine U149 Lactocine S
Classe II Peptides anti- <i>Listeria</i>	-IIa : poids moléculaire < 10 kDa -IIb : association de 2 peptides pour l'activité, poids moléculaire < 10 kDa	Stable Stable	Lactococcine MMF2 Sakacine G Lactococcine G Lacticine F
Classe III	-poids moléculaire < 30 kDa	Sensible	Helvéticine J Helvéticine V-1829 Lactacine A et B
Classe IV	-mélange indéfini de protéines, lipides et carbohydrates	Stable	Plantaricine S Leuconocine S Lactocine 27 Pediocine SJ1

9.2.3.3. Mode d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram⁻. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés.

Les Lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (un decaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Mc auliffe et *al.*, 2001 ; Twomey et *al.*, 2002 ; Bauer et *al.*, 2005).

Bactériocines de classe II: Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Dalet et *al.*, 2000 ; Gravesen et *al.*, 2002 ; Vadyvaloo et *al.*, 2004 ; Bauer et *al.*, 2005).

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram⁺. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (Oppegard et *al.*, 2007).

Bactériocines de classe III: Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin

A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (Nilsen et *al.*, 2003).

9.2.3.4. Production et conditionnement des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (Savijoki et *al.*, 2006)

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines (Parente et *al.*, 1999). Les conditions optimales de production de bactériocines ne sont généralement pas les mêmes que les conditions optimales de croissance. Néanmoins, la majorité des travaux ont montré que la récupération des agents antimicrobiens doit se faire en fin de phase exponentielle ou en phase stationnaire. En ce qui concerne les conditions de culture, plusieurs paramètres sont à prendre en compte tels que la température, le pH et la composition du milieu de culture (Leonard ,. 2013).

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation par exemple (Parente et *al.*, 1999).

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

9.2.3.5. Combinaison de différentes bactériocines pour augmenter la durée de vie du produit

La combinaison de différentes bactériocines permet d'augmenter l'activité et le spectre d'action, tout particulièrement en combinant des bactériocines appartenant à des classes différentes (Vignolo et *al.*, 2000). Cependant, une attention toute particulière devra être portée au développement de résistances chez les bactéries cibles (Deegan et *al.*, 2006).

9.2.3.6. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents

La combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimique ou physique donne des résultats prometteurs pour la conservation des aliments. Les molécules chimiques peuvent être des acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles (l'impact sur les propriétés organoleptiques doit être soigneusement évalué) ou des agents chélatants tel que l'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate. Ces agents chélatants permettent de séquestrer les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram⁻ permettant aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité. Les traitements physiques peuvent être des traitements thermiques, le stockage sous atmosphère contrôlée, l'application de champs électriques ou l'application des hautes pressions (Rodgers, 2004 ; Deegan et *al.*, 2006 ; Galvez et *al.*, 2007). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ou de protéines de soja a été suggérée afin de prévenir la dégradation des bactériocines par les protéases présentes dans le produit à conserver (Kouakou et *al.*, 2008).

9.2.3.7. Interactions entre les souches de bactéries lactiques

Lorsque les bactéries lactiques sont utilisées en cultures mixtes pour la fermentation du lait, des interactions entre les différentes souches se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes: l'antagonisme et la stimulation (Grattepanche, 2005).

Phénomènes d'antagonisme: La fermentation est historiquement utilisée comme un mode de conservation des aliments.

Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques. Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices, il s'agit d'auto-inhibition, et/ou des autres souches constituant le levain (Rodgers, 2004 ; Deegan et *al.*, 2006 ; Galvez et *al.*, 2007).

Ces interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices sont connues sous le nom d'amensalisme. C'est notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes, homofermentaire et hétérofermentaire, des bactéries lactiques (Rodgers, 2004 ; Deegan et *al.*, 2006 ; Galvez et *al.*, 2007).

L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase d'hydrogène peut être renforcée par le système lactoperoxydase-thiocyanate présent naturellement dans le lait (Gilliland, 1985).

Les phénomènes de compétition constituent la deuxième catégorie des interactions négatives fréquemment rencontrées lors de la fermentation du lait par une culture mixte. Rodgers, 2004 ; Deegan et *al.*, 2006 ; Galvez et *al.*, 2007 ont ainsi observé que la croissance d'une souche de lactocoques dans le lait ayant déjà préalablement servi à la préculture de la souche était inférieure à celle réalisée dans du lait frais. Ce phénomène s'explique par l'épuisement de la fraction azotée de faible poids moléculaire durant la préculture (Juillard et *al.*, 1990).

Phénomènes de stimulation : Les phénomènes de stimulation sont divisés en plusieurs catégories. On distingue le commensalisme, lorsqu'une population est stimulée par la production d'une substance essentielle ou la destruction d'un facteur inhibiteur par une autre population et le mutualisme ou la protocoopération, lorsque l'interaction est positive pour chacune des populations. Dans le cas du mutualisme, l'interaction est nécessaire à la survie des populations contrairement à la protocoopération où l'interaction présente un caractère facultatif (Choisy et *al.*, 1997).

Cultures mixtes des bactéries lactiques : Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soit avec d'autres microorganismes (bactéries non lactiques, levures ou moisissures) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités. On les classe en deux catégories : les interactions positives qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Cholet, 2006 ; Monnet *et al.*, 2008).

9.2.4. Utilisation des bactériocines en industrie agroalimentaire

A ce jour, l'application des bactériocines dans le secteur agroalimentaire pour bio préservation passe par trois stratégies :

- les bactériocines peuvent être ajoutées directement à l'aliment ;
- les bactéries productrices peuvent être ajoutées à l'aliment où elles produiront la bactériocine (cultures starter ou protectrices) ;
- la bactériocine peut être incorporée dans l'emballage alimentaire pour, par la suite, une libération de la molécule au contact de l'aliment

Les bactériocines peuvent être utilisées sous différentes formes : forme purifiée, semi-purifiée ou sous forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un produit alimentaire (Tableau 5)

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées après production en fermenteur sont considérées comme des additifs alimentaires. Malgré le nombre important de bactériocines identifiées à ce jour, la nisine est actuellement la seule ayant reçu l'autorisation de nombreux pays pour son utilisation comme additif alimentaire (E234) (Dortu et Thonart, 2009). Commercialisée depuis 1953, elle est utilisée depuis plusieurs décennies pour préserver la qualité sanitaire de divers types d'aliments (Rodriguez *et al.*, 2000). Cet antibiotique de type I possède un large spectre d'action contre divers microorganismes pathogènes à Gram positif tels que *Listeria sp.*, *Clostridia sp.*, *Staphylococcus sp.*, L'utilisation des bactériocines pures ne présente

pas de vrai intérêt pour l'agroalimentaire. En effet, les bactériocines ne peuvent être intégrées dans la composition d'un aliment que si elles possèdent l'approbation des autorités sanitaires (Deegan *et al.*, 2006).

Les bactériocines peuvent également être ajoutées sous forme de concentré obtenu après la fermentation d'un substrat alimentaire (lait, lactosérum par exemple). Cette préparation contient, outre la bactériocine, d'autres métabolites tel que l'acide lactique. Actuellement, la Pédioicine (ALTA™ 2341, Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Irlande) (Dortu et Thonart, 2009) et la Jensenine G (Microgard™, Danisco) (Grinstead et Barefoot, 1992) sont commercialisées sous cette forme. La préparation ALTA™ 2341 est capable de préserver les viandes fraîches et fermentées, des contaminations causées par *Listeria monocytogenes* (Deegan *et al.*, 2006). La Variacine utilisée comme ingrédient fermenté a permis la protection de produits laitiers contre *Bacillus cereus* (O'Mahony *et al.*, 2001). Ces préparations sont considérées comme des ingrédients fermentés. Leurs ajouts dans les aliments fermentés (ex. yaourt) ou non fermentés ne nécessitent pas l'approbation des autorités sanitaires ni la mention sur l'emballage (Deegan *et al.*, 2006).

Un autre moyen d'appliquer les bactériocines consiste en l'utilisation des bactéries productrices. En effet, plusieurs études ont montré que certaines bactéries lactiques sont capables de produire leurs bactériocines dans la matrice alimentaire. Ces bactéries peuvent être ajoutées comme starter dans les produits fermentés ou comme cultures protectrices dans les produits non fermentés (Dortu et Thonart, 2009). Les bactéries starter doivent accomplir leur principal rôle qui est la fermentation de l'aliment et lui conférer les propriétés organoleptiques désirées, tout en produisant les bactériocines. Dans le cas où les bactéries sont employées comme cultures protectrices, elles doivent être capables de produire des bactériocines sans modifier les propriétés organoleptiques de l'aliment. Dans les deux cas, la nature de l'aliment, sa composition et les conditions de conservation doivent être bien étudiées afin de favoriser la croissance des souches productrices (Dortu et Thonart, 2009). L'ajout des bactéries lactiques productrices dans les denrées présente certains avantages par rapport à l'ajout direct des bactériocines. En effet, d'un point de vue législatif, la majorité des bactéries lactiques bénéficient du statut « GRAS » attribué par la Food

Drug Administration. De plus, ces microorganismes possèdent une image de produit « naturel » vis-à-vis des consommateurs et leur utilisation entraîne des coûts moindres comparés à la production des bactériocines. Néanmoins, les souches bactériennes utilisées comme productrices de bactériocines dans les aliments doivent répondre à plusieurs critères de sélection. Elles doivent être capables de se développer et de survivre dans les conditions de fabrication et de conservation des denrées alimentaires sans pour autant engendrer des modifications au niveau des propriétés organoleptiques de l'aliment. De plus, les souches sélectionnées doivent synthétiser les bactériocines dans l'aliment en quantité suffisante pour qu'elles soient capables de jouer leur rôle de protection. Il faut également que ces bactéries produisent leurs bactériocines au moment adéquat, c'est-à-dire avant la multiplication de l'agent pathogène et/ou d'altération.

Sur le marché, plusieurs cultures protectrices sont déjà commercialisées. A titre d'exemple, une souche de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* productrice de nisine est commercialisée sous le nom de BS-10[®] par CHR Hansen (Danemark) et des souches de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus paracasei* et *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* sont commercialisées sous le nom de HOLDBAC[™] par le groupe DANISCO (Danemark) (Rodgers, 2008).

La troisième stratégie qui donne lieu à la publication de nombreux travaux est l'incorporation de bactériocine partiellement purifiée dans un support pour l'emballage alimentaire pour une protection de surface. En effet, ils permettent une meilleure stabilité et un relargage contrôlé du composé. Ces emballages actifs antimicrobiens, autorisés en Europe depuis 2004 ne peuvent contenir que les additifs alimentaires autorisés dans la formulation des aliments. De ce fait, la nisine est la seule bactériocine autorisée dans les emballages actifs. Plusieurs travaux ont montré la possibilité de l'incorporation des bactériocines dans les emballages alimentaires à base de polypeptides ou de polysides. Par exemple, l'incorporation de la nisine à 1 000 UI.cm⁻² d'un film de caséinate de sodium servant comme couche protectrice d'un fromage à pâte semi-dure artificiellement contaminé par *Listeria innocua* a permis la réduction du nombre de cellules formant une colonie à la surface de l'aliment. Cette

approche pourrait être efficace pour préserver la qualité sanitaire de l'aliment et prolonger sa durée de conservation (Cao-Hoang *et al.*, 2010). L'incorporation de l'Entéroline synthétisée par *Enterococcus faecium* CRL1385 dans des films comestibles à base de gélatine et de gluten de blé est aussi un exemple de solution potentielle pour contrôler la contamination des produits alimentaires par le pathogène *Listeria monocytogenes* (Ibarguren *et al.*, 2010).

Tableau 5 : Application des bactériocines comme conservateurs alimentaires.

<i>Domaine d'application</i>	<i>Bactériocines</i>	<i>Mise en œuvre</i>	<i>Souche cible</i>	<i>Référence</i>
Produits laitiers	Lacticine 3147	Culture starter	Bactéries lactiques non starter	Ryan <i>et al.</i> , 1996
	Pédiocine PA-1/AcH	Bactériocines purifiées	<i>L. monocytogenes</i>	Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
	Entéroccine AS-48	Bactériocines partiellement purifiées	<i>L. monocytogenes</i>	Ananou <i>et al.</i> , 2010
	Nisine	Film de caséinate de sodium	<i>L. innocua</i>	Cao-Hoang <i>et al.</i> , 2010
	Entéroccine 416K1	Film de PET (poly(éthylène terephthalate))	<i>L. monocytogenes</i>	Iseppi <i>et al.</i> , 2011
	Bactériocines de classe IIa	Bactériocines partiellement purifiées (surnageants de culture)	<i>L. monocytogenes</i>	Hartmann <i>et al.</i> , 2011
	BLS P34 produite par <i>Bacillus</i> sp. P34	Encapsulées dans des nanovésicules de lécithine de soja	<i>L. monocytogenes</i>	Da Silva Malheiros <i>et al.</i> , 2012
Nisine A,Z Lacticine 481	Culture starter	<i>L. monocytogenes</i>	Dal Bello <i>et al.</i> , 2012	
Viandes	Pédiocines	Bactériocines purifiées	<i>L. monocytogenes</i>	Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
	Bactériocine de classe IIa	Culture starter	<i>L. monocytogenes</i>	Benkerroum <i>et al.</i> , 2004
	Nisine	Film et billes d'alginate de sodium	<i>Staphylococcus aureus</i>	Milette <i>et al.</i> , 2007
	Sakacine G	Culture protectrice	<i>L. innocua</i>	Héquet <i>et al.</i> , 2007
	Nisine	Film plastique	Entérobactéries, <i>Carnobacterium</i> , LAB, <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Ercolini <i>et al.</i> , 2010
	Entéroccine 416K1	Film de PET (poly(éthylène terephthalate))	<i>L. monocytogenes</i>	Iseppi <i>et al.</i> , 2011
	Bactériocines de classe IIa	Bactériocines partiellement purifiées (surnageants de culture)	<i>L. monocytogenes</i>	Hartmann <i>et al.</i> , 2011
	Bactériocines partiellement purifiées (surnageants de culture issus de Lactiguard® (consortium de trois souches de LAB))	<i>L. monocytogenes</i>	Koo <i>et al.</i> , 2012	
Poissons	Nisine	Film plastique	<i>L. monocytogenes</i>	Neetoo <i>et al.</i> , 2008
Fruits et légumes	Mesentericin Y105	Culture bioprotectrice	<i>L. monocytogenes</i>	Trias <i>et al.</i> , 2008
	Entéroccine produite par <i>Enterococcus faecium</i> CRL1385	Film comestible à base de gélatine et de gluten de blé	<i>L. monocytogenes</i>	Ibarguren <i>et al.</i> , 2010

2^{ème}Partie:

ETUDE EXPERIMENTALE

*Article 1 : M. BOUZAIID, R. CHATOUI, H. LATRACHE, A. HASIB,
2016. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains isolated from
camel meat and raw milk (Morocco)*

Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 10, N°1, p : 1-12

1. Introduction

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à actions bactéricides et /ou bactériostatiques comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reuterine et les bactériocines (De Vuyst et Vandamme, 1994).

Les bactériocines sont des peptides, produits et secrétés à l'extérieure de la cellule des bactéries lactiques. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (Jack et al., 1995 ; Matilla et al., 1999).

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs technologies pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique, et pharmaceutique. De nos jours, il y a une forte tendance à réduire l'utilisation des substances chimiques et traitement thermique pour la conservation des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques (Rodgers, 2001 ; Vermeiren et al., 2004).

Parmi les nombreuses possibilités techniques envisageables pour la conservation des aliments, celles utilisant des microorganismes vivants ou leurs métabolites antimicrobiens, connaissent un intérêt croissant. En effet, les consommateurs sont de plus en plus demandeurs d'aliments aux qualités organoleptiques préservées qui soient de plus exempts d'additifs, de sel ou de traitements pouvant avoir un impact sur leur santé.

Cet attrait des consommateurs pour des produits plus «naturels» combiné à l'intérêt des industriels à minimiser les procédés, tout en garantissant la qualité sanitaire des aliments, ont stimulé les recherches visant à développer des moyens de conservation naturels.

En effet ces bactériocines naturelles, produites par les bactéries lactiques, pourraient être utilisées pour améliorer la qualité et la sécurité des aliments. La seule bactériocine dont l'utilisation est actuellement autorisée en tant qu'additif alimentaire est la nisine (E234), produite par la souche *Lactococcus lactis* (Delves-Broughton, 1990 ; De Vuyst et al., 1996).

L'objectif de ce travail consiste à isoler des souches de bactéries lactiques à partir de la viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache, et d'évaluer leur activité antimicrobienne vis-à-vis de certains germes pathogènes et d'altération.

2. Matériel et méthodes

2.1 Isolement et identification des bactéries lactiques (BL)

Sept souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de deux biotopes différents, le lait cru de vache et la viande hachée de dromadaire. Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues.

L'isolement est réalisé sur milieu MRS (Difco, Detroit, USA) solide, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Les cultures sont incubées 24 heures à 30°C dans des boîtes de Pétri à l'obscurité. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu MRS solide. La conservation se fait sur milieu MRS incliné à +4°C en tubes à essais à l'obscurité.

L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : forme, catalase, température de croissance, production de Gaz carbonique, sensibilité au NaCl, fermentation de divers sucres (Sharpe et al., 1966) et hydrolyse d'arginine sur milieu BCP16.

2.2 Etude de l'activité antimicrobienne des souches de BL

2.2.1 Préparation de l'extrait de la culture de BL

Les sept souches de bactéries lactiques sont cultivées sur milieu MRS liquide trois jours à 30°C, puis testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion en puits en utilisant

le milieu Mueller Hinton Agar comme support (Barefoot et Klaenhammer, 1983). La substance bioactive, présumée être une bactériocine, est obtenue après centrifugation à 10 000 tours/min de 20 ml de la culture des souches étudiées sur milieu MRS. Le surnageant a été neutralisé par NaOH 0,1 N de façon à obtenir un pH de 6,5 afin d'éliminer l'effet des acides organiques accumulés dans le milieu de culture, puis on ajoute quelques gouttes de catalase pour éliminer l'effet du peroxyde d'oxygène. Enfin, notre extrait des cultures contenant les molécules bioactives, présumées être des bactériocines, est prêt pour le test de l'activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes utilisées dans cette étude.

2.2.2 Activation de souches pathogènes

Les treize souches pathogènes utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne proviennent du Laboratoire de bactériologie médicale de l'INH de Rabat.

Ces souches pures, stockées dans des cryotubes à -20°C, sont ensemencées dans des tubes à essais contenant les milieux de cultures BHI pour les bactéries pathogènes et Sabouraud liquide pour les levures, puis incubées à 37°C/24h à 48h. Par la suite elles sont ensemencées sur des boîtes contenant les milieux Cled et Sabouraud solides, respectivement pour les bactéries et les levures, puis incubées à 37°C pendant 24h.

2.2.3 Préparation des suspensions

Les boîtes de Pétri contenant les souches actives de durée de vie de 24h sont utilisées pour la préparation des suspensions microbiennes à base d'eau physiologique. On répartit stérilement de l'eau physiologique dans des tubes à raison de 9 ml par tube, puis on met en suspension les colonies qu'on a déjà activées de telle sorte à avoir une concentration finale d'environ 0,5 Mc Farland.

2.2.4 Diffusion en puits :

La gélose de Mueller Hinton (MH) est répartie dans les boîtes de Pétri, puisensemencée par un écouvillon qu'on trempe dans la suspension bactérienne jeune de la souche pathogène. Puis on laisse sécher pendant 5 min environs, et après on réalise aseptiquement, sur cette couche basale du milieu MH, des puits de 5mm de diamètre.

Ces puits seront remplis par l'extrait des cultures de bactéries lactiques à tester et leurs différentes dilutions. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. La lecture de l'activité antimicrobienne se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm (Pulsani et al., 1979).

3. Résultats et Discussion

3.1 Identification des bactéries lactiques

L'observation microscopique a montré deux formes de cellules, coques et bâtonnets. Les bâtonnets constituent 94,74% de l'effectif total et sont représentés par le genre *Lactobacillus*. Les formes coques observées sont représentées par le genre *Streptococcus* avec 5,26% de l'effectif total. Les sept souches sélectionnées sont des bacilles Gram positif, immobiles, catalases négatives et ne produisant pas de gaz (tableau 6).

L'identification physiologique et biochimique des sept souches de bactéries lactiques a permis de mettre en évidence 4 espèces différentes appartenant au genre *Lactobacillus*. Pour les trois groupes bactériens, deux bactéries lactiques appartiennent à la même espèce de deux biotopes différents (lait cru de vache et viande hachée de dromadaire), sauf le 4^{ème} groupe (représenté par *Lactobacillus salivarius*) qui reste indépendant et appartient à la viande hachée de dromadaire (Tableaux 6 et 7).

Tableau 6. Caractéristiques phénotypiques et physiologiques de sept souches du genre *Lactobacillus* isolées de la viande hachée de dromadaire et de lait cru de vache

L'aliment	Souches lactiques	Forme et Gram	Catalase	Production de Gaz	Croissance à la température		croissance en présence de NaCl		Croissance en présence d'Arginine
					30°C	40°C	2%	6%	
Lait de vache	BL1v	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL2v	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL3v	Bacille G+	-	-	+	+	+	-	+
Viande de dromadaire	BL1d	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL2d	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL3d	Bacille G+	-	-	+	+	+	-	+
	BL4d	Bacille G+	-	-	+	+	+	-	+

Tableau 7 : Caractéristiques biochimiques des souches du genre *Lactobacillus*

souches	Espèce	Sucres									
		dex	fru	suc	mal	glu	man	lac	rha	xyl	ara
BL1v et BL1d	<i>L.acidophilus</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
BL2v et BL2d	<i>L.amylovorus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BL3v et BL3d	<i>L.yamanashiensis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
BL4d	<i>L.salivarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Dex : dextrane ; **fru** : fructose ; **suc** : saccharose ; **mal** : maltose ; **glu** : glucose ;
man : mannitol ; **lac** : lactose ; **rha** : rhamnose ; **xyl** : xylose ; **ara** : arabinose ;
L : *lactobacillus*
v =origine de la souche est le lait de vache
d= origine de la souche est la viande haché de dromadaire

3.2. Activité antimicrobienne des molécules bioactives des BL

Les tests antimicrobiens des molécules bioactives (présumées être des bactériocines), secrétées par les sept souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de vache (BLv) et de la viande hachée de dromadaire (BLd), ont été effectués sur 13 souches pathogènes (tableau 8). Elles ont montré une activité inhibitrice sur l'ensemble des germes, sauf sur les germes pathogènes *E. coli* et *Enterococcus faecium*.

Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes, le diamètre d'inhibition varie entre 8 à 12 mm suivant la souche pathogène testée. L'inhibition est notée positive lorsque son diamètre d'inhibition est supérieur à 1mm au tour du puits (Schillinger et Lucke, 1989) (Photos 1 et 2).

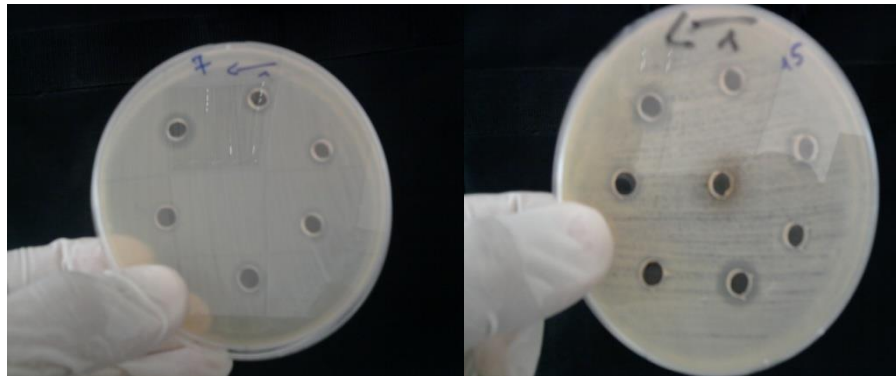


Photo 1 : Activité antimicrobienne des souches lactiques BL3v, BL3d, BL1d, BL4d, BL2v, BL1v et BL2d vis-à-vis de *Citrobacter freundii* (7) et *Klebsiella* (15)



Photo 2 : Activité antimicrobienne des souches lactiques BL3v, BL3d, BL1d, BL4d, BL2v, BL1v et BL2d vis-à-vis de *Salmonella enteritidis*

Les résultats du tableau 8 montrent que les molécules bioactives des souches de *Lactobacillus* BL3v, BL3d, BL2v, et BL2d sont les plus efficaces sur les germes pathogènes ciblées que ceux des souches BL1d, BL4d et BL1v. Notons que la souche BL4d ne montre aucune activité inhibitrice vis-à-vis des germes pathogènes utilisés ; alors que la souche BL3d montre le spectre d'activité le plus large avec un taux d'inhibition des germes pathogènes de l'ordre de 84,62% . En effet, elle développe les diamètres d'inhibitions les plus élevés (10 à 12 mm) sur six germes pathogènes (tableau 8). L'extrait de la culture de la souche BL2v a montré un taux d'inhibition de 61,54% et des diamètres d'inhibition de 10 à 11 mm. Les souches BL2d et BL3v présentent le même taux d'inhibition de 53,85% et ayant des diamètres d'inhibition de 10mm et 11mm, respectivement.

Tableau 8 : Diamètre de la zone d'inhibition de sept bactéries lactiques (BL) vis-à-vis de certaines souches pathogènes par la méthode de diffusion sur milieu Hinton

Diamètres d'inhibition (mm)							
<i>Lactobacillus</i>	Lait de vache			Viande de dromadaire			
Souches pathogènes	BL1v	BL2v	BL3v	BL1d	BL2d	BL3d	BL4d
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8	11	0	0	8	0
<i>Citrobacter freundii</i>	8	9,5	9	0	9	12	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	8	9,5	0
<i>Klebsiella sp</i>	0	11	8,5	8	10	9	0
<i>Salmonella sp</i>	0	9	8	9	8	11	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	0	10	9	0	9	11	0
<i>Shigella boydii</i>	0	9	8	0	0	10	0
<i>Salmonella paratyphimurium</i>	0	9	8	0	8	10	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae BLSE</i>	0	0	0	0	0	9	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	0	10	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	9	0	0	9	9	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition	7,69	61,54	53,85	15,39	53,85	84,62	0

Les sept souches bactériennes, isolées de deux biotopes (lait cru de vache et viande hachée de dromadaire) et identifiées, ont fait l'objet d'une étude de leur activité antibactérienne. Ces bactéries, appartenant au genre *Lactobacillus*, regroupent les espèces suivantes : *L. yamanashiensis* (BL3v et BL3d), *L. acidophilus* (BL1v et BL1d), *L. amylovorus* (BL2v et BL2d) issue des deux biotopes, et *L. salivarius* (BL4d) issue uniquement de la viande hachée de dromadaire (tableau 7).

En travaillant dans les conditions expérimentales permettant d'éliminer l'influence des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène, l'activité d'inhibition due aux molécules bioactives des quatre souches de deux espèces *Lactobacillus yamanashiensis* (BL3v et BL 3d) et *Lactobacillus amylovorus* (BL2v et BL2d), a révélé un large spectre vis-à-vis des germes pathogènes suivants : *Citrobacter freundii* ; *Klebsiella* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Salmonella enteritidis* ; *Salmonella paratyphimurium*, *Staphylococcus aureus* ; *Shigella boydii* et *Proteus mirabilis*. Dans le cas des espèces appartenant au genre *Lactobacillus*, des études effectuées par plusieurs auteurs, ont montré que la production de bactériocines varie selon l'espèce bactérienne (Allouche et al., 2010).

Les molécules bioactives extraites de la souche *L. yamanashiensis* BL3d, isolée de la viande hachée de dromadaire possèdent un pouvoir d'inhibition le plus large sur les germes pathogènes testés, qui est de l'ordre de 84,62%. Il serait donc utile d'identifier la nature (bactériocine ou autre) et le nombre de molécules bioactives responsables de cette activité, afin d'étudier les possibilités de son (leur) utilisation dans la

bio-préservation des aliments contre les germes responsables de toxico-infections alimentaires.

L'extrait de la culture de la souche de *L. amylovorus*, issue des deux biotopes, n'a inhibé que 8 germes pathogènes testés (61,54%). De Vuyst et al., (1996) a montré que la production de bactériocine d'amylovorin L471 par *L. amylovorus* est influencée par la température et le pH de sa croissance, ce qui pourrait expliquer le résultat que nous avons obtenu. D'autre part, l'apparition de la résistance à des bactériocines de classes différentes chez une bactérie cible, peut également être observée (Deegan et al., 2006 ; Naghmouchi et al., 2007).

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (Demazy et Thonart, 2005). Il a été montré que les bactériocines peuvent être dégradées par la protéase produite par les bactéries lactiques (Savijoki et al., 2006).

Conclusion générale

Dans une première partie nous avons réalisé une étude bibliographique détaillée sur les bactéries lactique : leur Habitat, Origine, Taxonomie et Caractéristiques des principaux genres. Nous avons présenté aussi leurs exigences nutritionnelles, génétique, rôle et activité.

Dans la partie expérimentale, nous avons conclu que les molécules bioactives secrétées par les souches de bactéries lactiques isolées de lait cru et de la viande hachée de dromadaire possèdent un pouvoir inhibiteur sur les germes responsables des toxi-infections alimentaires, tels que *Salmonella* et *Staphylococcus aureus*, et ceux responsables des infections urinaires tels que *Proteus* et *Klebsiella*.

En effet la bactériocine préparée à partir d'une culture de la souche *Lactobacillus yamanashiensis*, isolée de la viande de dromadaire, possède le spectre d'inhibition le plus élevé et des diamètres d'inhibition les plus grands. Cette souche montre des potentialités très intéressantes pour son application dans la lutte contre les micro-organismes pathogènes à l'origine de toxi-infections alimentaires.

Les bactéries lactiques productrices de bactériocines peuvent être utilisées comme ferment pour améliorer le contrôle de la flore pathogène et d'altération des aliments. Certes, la maîtrise de la production des bactériocines à partir de la souche *L. yamanashiensis* passe nécessairement par l'étude des conditions de sa culture, tels que le pH, la température, les nutriments de milieux de culture et la présence des enzymes protéolytiques. L'utilisation des bactériocines comme alternative aux additifs alimentaires et aux traitements thermiques pourra être une voie d'avenir pour la bio-conservation des aliments.

– References bibliographiques

Allouch F. N., Hellal A. et Laraba A. (2010): Etude de l'activité antimicrobienne des souches de *Lactobacillus thermophilus* utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*, 30, 13-20.

Aguirre, M. et Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Microbiology*, 75, 95–107.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., et Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17, 454–461.

Axelsson L., 2004. Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.) 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.

Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.J. et Lindgren S.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 2:131-136.

Bauer, R., Dicks, L. (2005) - Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 201-216.

Barefoot S. F., Klaenhammer T. R. (1983): Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(6), 1808-1815.

Béal C. et Sodini I., 2012 - Fabrication des yaourts et des laits fermentés. Techniques de l'Ingénieur (F 6315). Paris- France : 16 p.

Bruinenberg, P. G., Vos, P., et De Vos, W. M. (1992). Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains: regulation and effect on growth and acidification in milk. *Applied and environmental microbiology*, 58, 78–84.

Breidt, F. et Fleming, H. P. (1998). Modeling of the Competitive Growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in Vegetable Broth. *Applied and environmental microbiology*, 64, 3159–3165.

Boyaval P., Deborde C., Corre C., Blanco C. et Begue E., (1999). *Le lait*, 79 : 59-69.

Bottazzi v. et Dellaglio F. 1967. Acetaldehyde and diacétyle production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococi. *J. Dairy Res.* 34:109-113.

Buchanan, R. L. et Bagi, L. K. (1997). Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *Journal of FoodProtection*®,60, 254–261.

Budde, B. B., Hornbæk, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., et Koch, A. G. (2003). *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*,83, 171–184.

Byczkowski J. et Gessner T., 1988. Biological role of superoxide ion radical. *Int. J. Biochem.*20: 569-580

Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., et Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International journal of food microbiology*,131, 30–39.

Chafai S. 2006 : Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances-zootecniques du poulet chair, Mémoire de magister *Lakhdar de Batna* en sciences vétérinaires.

Choisy C., Desmazeaud M., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J.L ET Tourneur C. 1997. Les phénomènes microbiens. In : Le fromage. Ed. Eck A, Gillis JC, Lavoisier *Tec & Doc, Paris, France.* Pp. 377-446.

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

Cogan T.M. 1986. The leuconostocs: Milk products. In: Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods, CRC Press, Boca Raton, Florida,* pp. 25-40.

Cogan T.M. et Hill C. 1993. Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1, Second Edition, Chapman and Hall, London,* pp.193-255.

Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 269-280.

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., et Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, **79**, 483–499

Cao-Hoang, L., Chaine, A., Gregoire, L., et Wache, Y. (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food microbiology*, **27**, 940–944.

Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, Lindley ND, Loubière P (1995) Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol* **79**, 108-116

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

Detmers, F. J. M., Kunji, E. R. S., Lanfermeijer, F. C., Poolman, B., et Konings, W. N. (1998). Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, **37**, 16671-16679.

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. ET Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* **16**: 1058- 1071.

Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires (2009). Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Interest For Food Products Biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **13**, 143-154.

Doleyres Y., Paquin C., Leroy M. et Lacroix C., 2002. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized cellcultures in MRS-whey permeate medium. *App. Microbiol. Biotechnol.* **60** : 168-173

De Angelis, M. et Gobbetti, M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, **4**, 106–122.

Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M.C. ET Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage.* **1** : 25-116

Desmazeaud M. 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition sur les

bactéries lactiques. *Le Lait*. 63, 286-310.

Desmazeaud M. et Cogan T.M. 1996. Role of cultures in cheese ripening. In: Cogan T.M., Accolas J.P (Eds.), *Dairy Starter Cultures*. VCH Publishers, Inc., New York. pp.207-231.

Desmazeaud M.J. et De Roissard H. 1992. Métabolisme général des bactéries lactiques, *Bactéries lactiques*, aspects fondamentaux et technologiques. *Ed. Lorica Uriage*. 1, 169-207.

Douault. S et Corthier. G, (2000). Effets des bactéries lactiques ingérées avec les laits fermentés sur la santé. INRA, EDP Sciences. Pp : 102-104.

De Roissard et Luquet. 1985. Les bactéries lactiques édition Lorisa, volume 1, Luquet F. M, lait et produits laitiers, *Tec et Doc*, édition Lavoisier, Paris, p362-400- 402.

De Roissart H.B. et Luquet M., (1994). " Bactéries lactiques" Vol I. Ed. Lorica. 605 p

Desmazeaud M.J. et De Roissard H. 1992. Métabolisme général des bactéries lactiques, *Bactéries lactiques*, aspects fondamentaux et technologiques. *Ed. Lorica Uriage*. 1, 169 -207.

De Vuyst L. et Vandamme E. J. (1994): Nisin antibiotic product by *Lactococcus lactis subsp. Lactis* : biosynthesis, fermentation and application. In : Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Application, pp 91-142. Black Academy and Professional, London.

Delves-Broughton J. (1990): Nisin and its uses as a preservative. *Food Technol.*, 11, 100-112.

Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., et Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, **21**, 370–380.

De Vuyst L., Callewaert R. and Crabbe K. (1996): Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and unfavorable growth condition. *Microbiolgy*, 142, 817-827.

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. and Ross P. (2006): Bacteriocins tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16, 1058-1071.

Demazy C., et Thonart P. (2009) : Les bactériocines des bactéries lactiques :

Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (1), 143-154.

Eklund H., Cambillau C., Sjoberg B.M., Holmgren A., Jornvall H., Hoog J.O et Branden C.I. 1984. Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO. J.* 3: 1443–1449.

Farber J.M. 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology: a review. *J. Food Prot.* 54: 58-70.

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Oma, N. (2007) - Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120(1-2), 51-70.

Gerrit S., BART A.S. ET WIM J.M.E., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29: 591-610.

Guessas B., Hadadji M., Saidi N. ET Kihal M. 2006 Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *Dirasat, Agricultural Sci.* 32: 3, 304-312.

Gould G.W. 1991. Antimicrobial compound. In: Biotechnology and Food Ingredients eds. Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reinhold*, New York.pp.461-483.

Gould G.W. 1991. Antimicrobial compound. Ingredients, eds. Goldberg I. et Williams R. *Van.*, pp. 461-483.

Grinstead, D. A. et Barefoot, S. F. (1992). Jensenin G, a heat-stable bacteriocin produced by *Propionibacterium jensenii* P126. *Applied and environmental microbiology*,**58**, 215

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., et Givskov, M.(2002). Food spoilage interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, **78**, 79–97.

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. *1e Ed.*, Dunod. Paris. 136-144.

Guiraud J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. *Tec &Doc*, Dunod. Paris. 90-292.

Grattepanche F. 2005. Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse Ph.D. Université Laval : Québec, PQ : Canada

Haddie J.M., 1986. Other streptococci. *In* : Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.).1: 1070.

Hassan A.N. and FRANK J.F., 2001. Starter Cultures and their use. *In*: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

Hotchkiss J.H., Chen J.H. et Lawless H.T.1999. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 82:690-695.

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

Ibarguren, C., Vivas, L., Alejandra Bertuzzi, M., Apella, M. C., et Carina Audisio, M. (2010). Edible films with anti-*Listeria monocytogenes* activity. *International Journal of Food Science & Technology*, **45**, 1443–1449.

Jack R. W., Tagg J. R. et Ray B. (1995): Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol., Rev.*, 59, 171-200.

Jay M.J.1992. Modern Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 4 thed., New York.371-409.

Juillard V. et Richard J. 1990. Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non proteolytic strains of *Lactococcus lactis*. I. Effect of pre-culturing by a non-proteolytic variant. *Lait*.70: 425-438.

Jacobsen, T., Budde, B. B., et Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of applied microbiology*, **95**, 242–249

Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J.-C., et Richard, J.(1995). Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3024–3030.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 209–224.

Kunji, E. R., Hagting, A., De Vries, C. J., Juillard, V., Haandrikman, A. J., Poolman, B., et Konings, W. N. (1995). Transport of casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 1569–1574.

Khalid N.M. et Marth E.H., 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* **73** : 158-167.

Karovičová J., Kohajdová Z., Lactic acid fermented vegetable juices., *HORT. SCI., (PRAGUE)*, **30**, 2003 (4): 152–158

Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS*.

Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. **70**: 37- 49.

KLEIN G., PACK A., BONAPARTE C. ET REUTER G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 103-125.

KONG S. ET DAVISON A.J. 1980. The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻ and O₂ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**: 13-29.

Kulshrestha D.C. et Marth E.H. 1974. Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.* **37**: 510-516.

Lancefield R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**: 571–595

Lindgren S.E. ET Dobrogosz W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 149-164

Larpent, J.P. (1989). Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. Dans : Microbiologie alimentaire, Tome 2, Bourgeois, C.M., Larpent, J.P., Eds. Techniques et documentation Lavoisier, pp: 3-15.

Leclerc H., Gaillard F L. ET Simonet M., 1994. Les grands groupes de bactéries. *In* : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris.445.

Labioui H., EL Moualdi L., EL Yachioui M. ET Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux. **144** : 237-250.

Lyon, G. J. et Novick, R. P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*, **25**, 1389–1403.

Leonard L. (2013) ., Évaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique., Thèse ., 28-29

Lindgren, S.E., Dobrogosz,W.J., (1990) - Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations .*Ferms . Microbiol. Rev.*87,149-163.

McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., (2001) - Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 285–308

Malakar, P. K., Barker, G. C., Zwietering, M. H., et Van't Riet, K. (2003). Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *International journal of food microbiology*, **84**, 263–272.

Monnet V., Latrille E., BEAL C. et Corrieu G., 2008. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 512-592.

Mozzi F., Torino M I. et Valdez G F., 2010- Identification of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology. Food., Microbiol., Protocols. Humana. Press. Totowa. Vol: 1:* pp 183-190.10

Matilla-Sandholm T., Matto J. et Saarela M. (1999): LAB with health claim-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy. J.*, 9, 25-35.

Naghmouchi K., Kheadr E., Lacroix C. and Fliss I. (2007): Class I/class IIA bacteriocin cross resistance phenomenon in *L. monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 24, 718-727.

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

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. *Journal of Food Protection*, **62**, 336– 342.

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.

O'Mahony, T., Rekhif, N., Cavadini, C., et Fitzgerald, G. F. (2001). The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by *Kocuria*

OGIER J.C., CASALTA E., FARROKH C. ET SAÏHI A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 286- 290.

Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. (2007) - The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**(4), 210-219.

PIARD J.C. ET DESMAZEAND M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* **71**: 525-541.

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

POT B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1- 106.

Parente, E. et Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**, 628–638.

Pulsani S. R., Rao D. R. and Sunki G R. (1979): Antimicrobial Activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sciences*, **44**, 575-578.

Rao D.R., Reddy A.V., Pulusani S.R. ET Cornwell P.E.1984. Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B12., milk. *J. Dairy Sci.* **67**: 1169-1174

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., et Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, **4**, 124-140..

Rodgers S. (2001): Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures : a review. *Trend Food Sci. Technol.*, **12**, 276-284.

Rodriguez, E., Gonzalez, B., Gaya, P., Nunez, M., et Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, **10.**, 7–15.

Sanz B., Selgas D., Parejo I. ET Ordoñez J.A. **1988.** Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **6**: 199-205.

Saidi N. **2007.** La microflore lactique du lait cru de chèvre local : études, microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'intérêt bio-préservateur .,Thèse de Doctorat. Université d'Oran. 216 pp.

Savijokie K., Ingmer H. ET Varmanen P., **2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* **71** : 394-406.

Settanni, L. et Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food microbiology*, **27**, 691–697.

Sharpe M. E., Fryer T. F. and Smith D. G. (1966): Identification of the lactic acid bacteria. In Gibbs B. M., Skinner F. A. Ed. Identification methods for microbiologist. Academic Press, London.

Schillinger U. and Luke F. K. (1989): Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Enviro. Microbiol.*, **55**, 1901-1906.

Savijoki K., Ingmer H. and Vermanen P. (2006): Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 394-406.

STILES M.E. ET HOLZAPFEL W.H. **1997.** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36** : 1-29.

Salminen, S. et Von Wright, A. (2009). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Third Edition Taylor & Francis.*

Suskovic, J., Kos, B., Beganovic, J., Lebos Pavunc, A., Habjanic, K., et Matosic, S.(2010).Antimicrobial activity–the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, **48**, 296–307.

TAMIME A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). *3e Ed., John Wiley and Sons, Inc.*, New York. 261-366.

Trias, R. (2008). Lactic acid bacteria as bioprotective agents against food borne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables. *PhD thesis, University of Girona*.

Twomey D., Ryan M., Meaney B. and Hill C., (2002) - Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**: 165-185.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., et Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International journal of food microbiology*, **96**, 149–164.

VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DEVOS P., KERESTERS K. ET SWWINGS J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60** : 407.

Vignola C.L., Michel J.C., Paquin P., Moineau M., Pouliot M. et Simpson R.,(2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Techniques et documentation Lavoisier. 600p.

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 187–216..

Vadyvaloo, V., Hastings, J.W., van der Merwe, M.J., Rautenbach, M. (2002) Membranes of class IIa Bacteriocin-resistant *L. monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11),5223-5230.

Vermeiren L., Devlieghere F. and Debever J. (2004): Evaluation of meat born lactic bacteria as protective culture for the biopreservation of cooked meat product. *Int. J. Food Microbiol.*, **96**(2), 149-164.

Wagner M.K. ET Moberg L.J. 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technol.* **1**: 143-147.

ANNEXE

Publications scientifiques

ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DE VIANDE HACHEE DE DROMADAIRE ET DU LAIT CRU DE VACHE (MAROC)

M. BOUZAID¹, R. CHATOUI² ; H. LATRACHE¹, A. HASIB³.

⁽¹⁾ Laboratoire des bioprocédés et bio-interfaces, Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal ; Université Sultan Moulay Slimane, Maroc

⁽²⁾ Laboratoire d'écologie humaine ; Faculté des Sciences Marrakech

⁽³⁾ Laboratoire Environnement et Valorisation des agro-ressources, Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal; Université Sultan Moulay Slimane, Maroc

Correspondant : E-mail: bouzaidmostafa@yahoo.fr

RESUME

Les bactériocines sont des peptides produits par les bactéries lactiques (BL) et ayant une activité antibactérienne. Sept souches de BL ont été isolées et identifiées par des méthodes physiologiques et biochimiques, à partir de lait de vache et de viande hachée de dromadaire. Cette étude a montré que ces souches appartiennent à quatre espèces différentes de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* : *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. yamanashiensis* et *L. salivarius*. Ces sept souches ont été évaluées pour leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de treize germes pathogènes et d'altération. Les résultats de cette étude ont montré que la souche *L. yamanashiensis*, isolée de la viande hachée de dromadaire, possède un pouvoir inhibiteur plus large que celui des autres souches lactiques. En effet, cette souche est capable d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens* et trois espèces de *Salmonella*.

MOTS CLES : lait cru de vache, viande de dromadaire, bactériocine, bactéries lactiques, germes pathogènes.

ABSTRACT : Antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains isolated from camel meat and raw cow milk (Morocco)

Bacteriocins are peptides produced by lactic acid bacteria and having antibacterial activity. Seven strains were isolated from cow milk and camel meat, then identified by physiological and biochemical methods. This study revealed four different species of lactic strains of *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. yamanashiensis* and *L. salivarius*. These seven strains were evaluated for their inhibitory effect toward 13 pathogen and spoilage microorganisms. The results obtained showed that the strain *L. yamanashiensis*, isolated from camel meat, has a greater inhibitory effect than other lactic strains. Indeed the antimicrobial principle of this strain is capable of inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens* and three species of *Salmonella*.

KEYS WORDS: raw milk, camel meat, bacteriocins, lactic acid bacteria, pathogens

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à actions bactéricides et ou bactériostatiques comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reuterine et les bactériocines (De Vuyst et Vandamme, 1994). Les bactériocines sont des peptides, produits et secrétés à l'extérieure de la cellule des bactéries lactiques. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (Jack *et al.*, 1995 ; Matilla *et al.*, 1999).

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs technologies pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique, et pharmaceutique. De nos jours, il y a une forte tendance à réduire l'utilisation des substances chimiques et traitement thermique pour la conservation des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques (Rodgers, 2001 ; Vermeiren *et al.*, 2004).

En effet ces bactériocines naturelles, produites par les bactéries lactiques, pourraient être utilisées pour améliorer la qualité et la sécurité des aliments. La seule bactériocine dont l'utilisation est actuellement autorisée en tant qu'additif alimentaire est la nisine (E234), produite par la souche *Lactococcus lactis* (Delves-Broughton, 1990 ; De Vuyst *et al.*, 1996).

L'objectif de ce travail consiste à isoler des souches de bactéries lactiques à partir de la viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache, et d'évaluer leur activité antimicrobienne vis-à-vis de certains germes pathogènes et d'altération.

MATERIEL ET METHODES

1. Isolement et identification des bactéries lactiques (BL):

Sept souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de deux biotopes différents, le lait cru de vache et la viande hachée de dromadaire. Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues.

L'isolement est réalisé sur milieu MRS (Difco, Detroit, USA) solide, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Les cultures sont incubées 24 heures à 30°C dans des boîtes de Pétri à l'obscurité. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu MRS solide. La conservation se fait sur milieu MRS incliné à +4°C en tubes à essais à l'obscurité.

L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : forme, catalase, température de croissance, production de Gaz carbonique, sensibilité au NaCl, fermentation de divers sucres (Sharpe *et al.*, 1966) et hydrolyse d'arginine sur milieu BCP16.

2. Etude de l'activité antimicrobienne des souches de BL

2.1. Préparation de l'extrait de la culture de BL

Les sept souches de bactéries lactiques sont cultivées sur milieu MRS liquide

trois jours à 30°C, puis testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion en puits en utilisant le milieu Mueller Hinton Agar comme support (Barefoot et Klaenhammer, 1983). La substance bioactive, présumée être une bactériocine, est obtenue après centrifugation à 10 000 tours/min de 20 ml de la culture des souches étudiées sur milieu MRS. Le surnageant a été neutralisé par NaOH 0,1 N de façon à obtenir un pH de 6,5 afin d'éliminer l'effet des acides organiques accumulés dans le milieu de culture, puis on ajoute quelques gouttes de catalase pour éliminer l'effet du peroxyde d'oxygène. Enfin, notre extrait des cultures contenant les molécules bioactives, présumées être des bactériocines, est prêt pour le test de l'activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes utilisées dans cette étude.

2.2. Activation de souches pathogènes:

Les treize souches pathogènes utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne proviennent du Laboratoire de bactériologie médicale de l'INH de Rabat.

Ces souches pures, stockées dans des cryotubes à -20°C, sont ensemencées dans des tubes à essais contenant les milieux de cultures BHI pour les bactéries pathogènes et Sabouraud liquide pour les levures, puis incubées à 37°C/24h à 48h. Par la suite elles sont ensemencées sur des boîtes contenant les milieux Cled et Sabouraud solides, respectivement pour les bactéries et les levures, puis incubées à 37°C pendant 24h.

2.3. Préparation des suspensions :

Les boîtes de Pétri contenant les souches actives de durée de vie de 24h sont utilisées pour la préparation des suspensions microbiennes à base d'eau physiologique. On répartit stérilement de l'eau physiologique dans des tubes à raison de 9 ml par tube, puis on met en suspension les colonies qu'on a déjà activées de telle sorte à avoir une concentration finale d'environ 0,5 Mc Farland.

2.4. Diffusion en puits :

La gélose de Mueller Hinton (MH) est répartie dans les boîtes de Pétri, puis ensemencée par un écouvillon qu'on trempe dans la suspension bactérienne jeune de la souche pathogène. Puis on laisse sécher pendant 5 min environs, et après on réalise aseptiquement, sur cette couche basale du milieu MH, des puits de 5mm de diamètre. Ces puits seront remplis par l'extrait des cultures de bactéries lactiques à tester et leurs différentes dilutions. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. La lecture de l'activité antimicrobienne se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm (Pulsani *et al.*, 1979).

RESULTATS

1. Identification des bactéries lactiques

L'observation microscopique a montré deux formes de cellules, coques et bâtonnets. Les bâtonnets constituent 94,74% de l'effectif total et sont représentés par le genre *Lactobacillus*. Les formes coques observées sont représentées par le genre *Streptococcus* avec 5,26% de l'effectif total. Les sept souches sélectionnées sont des bacilles Gram positif, immobiles, catalases négatives et ne produisant pas de gaz (tableau I).

L'identification physiologique et biochimique des sept souches de bactéries lactiques a permis de mettre en évidence 4 espèces différentes appartenant au genre *Lactobacillus*. Pour les trois groupes bactériens, deux bactéries lactiques appartiennent à la même espèce de deux biotopes différents (lait cru de vache et viande hachée de dromadaire), sauf le 4^{ème} groupe (représenté par *Lactobacillus salivarius*) qui reste indépendant et appartient à la viande hachée de dromadaire (Tableaux I et II).

2. Activité antimicrobienne des molécules bioactives des BL

Les tests antimicrobiens des molécules bioactives (présümées être des bactériocines), secrétées par les sept souches de bactéries lactiques isolées à partir de

lait cru de vache (BLv) et de la viande hachée de dromadaire (BLd), ont été effectués sur 13 souches pathogènes (tableau III). Elles ont montré une activité inhibitrice sur l'ensemble des germes, sauf sur les germes pathogènes *E. coli* et *Enterococcus faecium*.

Tableau I. Caractéristiques phénotypiques et physiologiques de sept souches du genre *Lactobacillus* isolées de la viande hachée de dromadaire et de lait cru de vache

L'aliment	Souches lactiques	Forme et Gram	catalase	Production de Gaz	Croissance à la température		croissance en présence de NaCl		Croissance en présence d'Arginine
					30°C	40°C	2%	6%	
Lait de vache	BL1v	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL2v	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL3v	Bacille G+	-	-	+	+	+	-	+
Viande de dromadaire	BL1d	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL2d	Bacille G+	-	-	+	+	+	+	+
	BL3d	Bacille G+	-	-	+	+	+	-	+
	BL4d	Bacille G+	-	-	+	+	+	-	+

Tableau II. Caractéristiques biochimiques des souches du genre *Lactobacillus*

souches	Espèce	Sucres									
		dex	fru	suc	mal	glu	man	lac	rha	xyl	Ara
BL1v et BL1d	<i>L.acidophilus</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
BL2v et BL2d	<i>L.amylovorus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BL3v et BL3d	<i>L.yamanashiensis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
BL4d	<i>L.salivarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Dex : dextrane ; **fru** : fructose ; **suc** : saccharose ; **mal** : maltose ; **glu** : glucose ; **man** : mannitol ; **lac** : lactose ; **rha** : rhamnose ; **xyl** : xylose ; **ara** : arabinose ; *L* : *lactobacillus* : **v**=origine de la souche est le lait de vache ; **d**= origine de la souche est la viande haché de dromadaire

Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures biens distinctes, le diamètre d'inhibition varie entre 8 à 12 mm suivant la souche pathogène testée. L'inhibition est notée positive lorsque son diamètre d'inhibition est supérieur à 1mm au tour du puits (Schillinger et Lucke, 1989) (Photos 1 et 2).

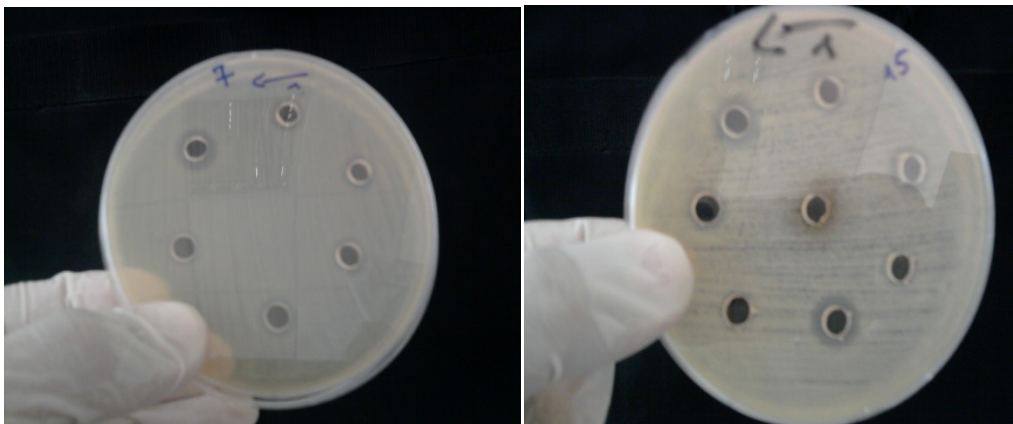


Photo 1 :Activité antimicrobienne des souches lactiques BL3v, BL3d, BL1d, BL4d, BL2v, BL1v et BL2d vis-à-vis de *Citrobacter freundii* (7) et *Klebsiella* (15)



Photo 2 : Activité antimicrobienne des souches lactiques BL3v, BL3d, BL1d, BL4d, BL2v, BL1v et BL2d vis-à-vis de *Salmonella enteritidis*

Les résultats du tableau III montrent que les molécules bioactives des souches de *Lactobacillus* BL3v, BL3d, BL2v, et BL2d sont les plus efficaces sur les germes

pathogènes ciblées que ceux des souches BL1d, BL4d et BL1v. Notons que la souche BL3d ne montre aucune activité inhibitrice vis-à-vis des germes pathogènes utilisés ; alors que la souche BL3d montre le spectre d'activité le plus large avec un taux d'inhibition des germes pathogènes de l'ordre de 84,62% . En effet, elle développe les diamètres d'inhibitions les plus élevés (10 à 12 mm) sur six germes pathogènes (tableau III). L'extrait de la culture de la souche BL2v a montré un taux d'inhibition de 61,54% et des diamètres d'inhibition de 10 à 11 mm. Les souches BL2d et BL3v présentent le même taux d'inhibition de 53,85% et ayant des diamètres d'inhibition de 10mm et 11mm, respectivement.

Tableau III. Diamètre de la zone d'inhibition de sept bactéries lactiques (BL) vis-à-vis de certaines souches pathogènes par la méthode de diffusion sur milieu Hinton

<i>Lactobacillus</i>	Diamètres d'inhibition (mm)						
	Lait de vache			Viande de dromadaire			
	BL1v	BL2v	BL3v	BL1d	BL2d	BL3d	BL4d
Souches pathogènes							
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8	11	0	0	8	0
<i>Citrobacter freundii</i>	8	9,5	9	0	9	12	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	8	9,5	0
<i>Klebsiella sp</i>	0	11	8,5	8	10	9	0
<i>Salmonella sp</i>	0	9	8	9	8	11	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	0	10	9	0	9	11	0
<i>Shigella boydii</i>	0	9	8	0	0	10	0
<i>Salmonella paratyphimurium</i>	0	9	8	0	8	10	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	9	0
BLSE							
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	0	10	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	9	0	0	9	9	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0
Pourcentage d'inhibition	7,69	61,54	53,85	15,39	53,85	84,62	0

DISCUSSION

Les sept souches bactériennes, isolées de deux biotopes (lait cru de vache et viande hachée de dromadaire) et identifiées, ont fait l'objet d'une étude de leur activité antibactérienne. Ces bactéries, appartenant au genre *Lactobacillus*, regroupent les espèces suivantes : *L. yamanashiensis* (BL3v et BL3d), *L. acidophilus* (BL1v et BL1d), *L. amylovorus* (BL2v et BL2d) issue des deux biotopes, et *L. salivarius* (BL4d) issue uniquement de la viande hachée de dromadaire (tableau II).

En travaillant dans les conditions expérimentales permettant d'éliminer l'influence des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène, l'activité d'inhibition due aux molécules bioactives des quatre souches de deux espèces *Lactobacillus yamanashiensis* (BL3v et BL 3d) et *Lactobacillus amylovorus* (BL2v et BL2d), a révélé un large spectre vis-à-vis des germes pathogènes suivants : *Citrobacter freundii* ; *Klebsiella* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Salmonella enteritidis* ; *Salmonella paratyphimurium*, *Staphylococcus aureus* ; *Shigella boydii* et *Proteus mirabilis*. Dans le cas des espèces appartenant au genre *Lactobacillus*, des études effectuées par plusieurs auteurs, ont montré que la production de bactériocines varie selon l'espèce bactérienne (Allouche *et al.*, 2010).

Les molécules bioactives extraites de la souche *L. yamanashiensis* BL3d, isolée de la viande hachée de dromadaire possèdent un pouvoir d'inhibition le plus large sur les germes pathogènes testés, qui est de l'ordre de 84,62%. Il serait donc utile d'identifier la nature (bactériocine ou autre) et le nombre de molécules bioactives responsables de cette activité, afin d'étudier les possibilités de son (leur) utilisation dans la bio-préservation des aliments contre les germes responsables de toxi-infections alimentaires.

L'extrait de la culture de la souche de *L. amylovorus*, issue des deux biotopes, n'a inhibé que 8 germes pathogènes testés (61,54%). De Vuyst *et al.*, (1996) a montré

que la production de bactériocine d'amylovorin L471 par *L. amylovorus* est influencée par la température et le pH de sa croissance, ce qui pourrait expliquer le résultat que nous avons obtenu. D'autre part, l'apparition de la résistance à des bactériocines de classes différentes chez une bactérie cible, peut également être observée (Deegan *et al.*, 2006 ; Naghmouchi *et al.*, 2007).

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (Demazy et Thonart, 2005). Il a été montré que les bactériocines peuvent être dégradées par la protéase produite par les bactéries lactiques (Savijoki *et al.*, 2006).

CONCLUSION

Les molécules bioactives secrétées par les souches de bactéries lactiques isolées de lait cru et de la viande hachée de dromadaire possèdent un pouvoir inhibiteur sur les germes responsables des toxi-infections alimentaires, tels que *Salmonella* et *Staphylococcus aureus*, et ceux responsables des infections urinaires (*Proteus* et *Klebsiella*). En effet la bactériocine préparée à partir d'une culture de la souche *Lactobacillus yamanashiensis*, isolée de la viande de dromadaire, possède le spectre d'inhibition le plus élevé et des diamètres d'inhibition les plus grands. Cette souche montre des potentialités très intéressantes pour son application dans la lutte contre les micro-organismes pathogènes à l'origine de toxi-infections alimentaires.

Les bactéries lactiques productrices de bactériocines peuvent être utilisées comme ferment pour améliorer le contrôle de la flore pathogène et d'altération des aliments. Certes, la maîtrise de la production des bactériocines à partir de la souche *L. yamanashiensis* passe nécessairement par l'étude des conditions de sa culture, tels que le pH, la température, les nutriments de milieux de culture et la présence des enzymes

protéolytiques. L'utilisation des bactériocines comme alternative aux additifs alimentaires et aux traitements thermiques pourra être une voie d'avenir pour la bioconservation des aliments.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allouch F. N., Hellal A. et Laraba A. (2010)** : Etude de l'activité antimicrobienne des souches de *Lactobacillus thermophilus* utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*, 30, 13-20.
- Barefoot S. F., Klaenhammer T. R. (1983)**: Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(6), 1808-1815.
- De Vuyst L. et Vandamme E. J. (1994)** : Nisin l'antibiotique produit par *Lactococcus lactis subsp. Lactis* : biosynthèse, fermentation et application. In : Bactériocine de Lactobacilles : Microbiologie, Génétique et Application, pp 91-142. Black Academy and Professional, London.
- Delves-Broughton J. (1990)**: Nisin and its uses as a preservative. *Food Technol.*, 11, 100-112.
- De Vuyst L., Callewaert R. and Crabbe K. (1996)**: Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and unfavorable growth condition. *Microbiology*, 142, 817-827.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. and Ross P. (2006)**: Bacteriocins tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16, 1058-1071.
- Demazy C., et Thonart P. (2009)** : Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (1), 143-154.
- Jack R. W., Tagg J. R. et Ray B. (1995)**: Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol Rev.*, 59, 171-200.
- Matilla-Sandholm T., Matto J. et Saarela M. (1999)**: LAB with health claim-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy. J.*, 9, 25-35.

- Naghmouchi K., Kheadr E., Lacroix C. and Fliss I. (2007):** Class I/class IIA bacteriocin cross resistance phenomeneon in *L. monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 24, 718-727.
- Pulsani S. R., Rao D. R. and Sunki G R. (1979):** Antimicrobial Activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sciences*, 44, 575-578.
- Rodgers S. (2001):** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures : a review. *Trend Food Sci. Technol.*, 12, 276-284.
- Sharpe M. E., Fryer T. F. and Smith D. G. (1966):** Identification of the lactic acid bacteria. In Gibbs B. M., Skinner F. A. Ed. Identification methods for microbiologist's. Academic Press, London.
- Schillinger U. and Luke F. K. (1989):** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Enviro. Microbiol.*, 55, 1901-1906.
- Savijoki K., Ingmer H. and Vermanen P. (2006):** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 394-406.
- Vermeiren L., Devlieghere F. and Debever J. (2004):** Evaluation of meat born lactic bacteria as protective culture for the biopreservation of cooked meat product. *Int. J. Food Microbiol.*, 96(2), 149-164.

Contribution à la validation de traitement thermique de pasteurisation des olives **vertes** en conserve.

Contribution to the validation of thermal pasteurization treatment of green olives canned

M. Bouzaid^{1,2}, M. Kessad¹, M. Hazzab¹, S. Ourouadi¹, A. El Khiraoui¹,
H. Moumene¹, A. Boulli¹, A. Hasib¹

1 Laboratoire Environnement et Valorisation des Agro-ressources, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, Maroc

2 Laboratoire des Bioprocédés et Bio-interfaces, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, Maroc

Received xx xx 2016, Revised xx xx 2016, Accepted xx xx 2016

*Corresponding author. E-mail: ahasib@yahoo.fr (A. Hasib); Tel (212) 61 38 69 02; Fax: (212) 48 52 01

Résumé

Ce travail s'intéresse au processus de la validation du barème thermique appliqué par l'entreprise pour l'appertisation des olives vertes de table. Le barème conçu présente une soumission du produit à une température T° constante de 90°C pendant au moins 20 min « Palier de T° ». Au cours du temps de traitement, des enregistrements de températures dans l'autoclave ont été effectués, principalement aux points critiques ou froids qui présentent le centre du produit et le milieu des 4 paniers disposés dans un plan bien défini. Des calculs des valeurs pasteurisatrices et les paramètres de transferts de chaleur dans le produit sont déterminés pour le produit dans chacun des paniers. Les données obtenues montrent que les paniers 1, 2 et 3 sont situés dans une zone plus froide par rapport au panier 4 qui se situe dans la zone qui reçoit le plus de la chaleur. Pourtant, les valeurs pasteurisatrices déterminées dans les quatre paniers situés à différents endroits de l'autoclave sont toutes supérieures (VP₁:34,6; VP₂: 36,9; VP₃: 34,9; VP₄:40,6) à la valeur référence F₀ = 30 min nécessaire pour la pasteurisation des olives vertes de table à une T° = 90°C. Ceci confirme l'atteinte de la stérilité commerciale et la validité du barème. Des analyses de paramètres organoleptiques sont effectuées pour confirmer en même temps les qualités nutritionnelle et sanitaire des conserves des olives vertes produits par l'entreprise.

Mots clés : Appertisation, Barème thermique, Olives vertes, , Qualité nutritionnelle, Qualité organoleptique.

Abstract

This work is interested in the process of the validation of the thermal Scale applied by the company for canning of green olives of table. Scale conceived presents a tender of the product to a temperature T° constant of 90°C during at least 20 min "Stage of T°". In the course of the processing time, recordings of temperatures in the autoclave were carried out, mainly at the critical or cold points which present the center of the product and the medium of the 4 shopping carts arranged on a well defined plane. Calculations of the values pasteurisatrices and the parameters of transfers of heat in the product are given for the product in each shopping cart. The data obtained show that shopping carts 1.2 and 3 are located in a colder zone compared to the shopping cart 4 which is located in the zone which receives the most heat. However, the values pasteurisatrices determined in the four shopping carts located at various places of the autoclave are all higher (VS₁: 34.6; VS₂: 36.9; VS₃: 34.9; VS₄: 40.6) with the value F₀=30min reference necessary for the pasteurization of green olives of table to T°= 90°C. This confirms the attack of commercial sterility and the validity of the Scale. Organoleptic analyses of parameters are carried out to confirm nutritional and medical quality at the same time preserves of green olives produced by the company

Keywords: Canning, Green olives, Nutritional quality , Organoleptic quality, Thermalscale .

1. Introduction

L'appertisation est parmi les méthodes de conservation des olives **vertes**, c'est un procédé qui combine la préparation d'aliments dans des boîtes de conserve étanches et leur pasteurisation par la chaleur. Ce traitement thermique est appliqué afin d'inactiver les enzymes et de détruire les micro-organismes, dont la présence pourrait rendre l'aliment impropre à la consommation. Cependant, la stérilité absolue n'existe pas ; Ce qu'on recherche lorsqu'on stérilise un aliment est la stérilité commerciale où le risque de contamination est statistiquement improbable. Dans cet objectif, l'industrie de la conserve n'a cessé de se développer et de chercher à diversifier ses méthodes et à faire évoluer ses produits [1].

Les olives vertes de table constituent la denrée végétale fermentée la plus populaire au Maroc [2]. En effet La filière oléicole, participant à 5 % du PIB national, avec une production annuelle de 1.500.000 tonnes d'olives et de 160.000 tonnes d'huile, reste l'une de ces principales filières [3].

En outre, dans les conserveries des olives **vertes**, la pasteurisation stabilisatrice est le traitement thermique appliqué, surtout pour les produits acides, pour détruire les germes **pathogènes**. **Mais** cette destruction des micro-organismes se fait au détriment des **qualités** nutritive et organoleptique des aliments [4]. En fait, nombreuses vitamines et protéines sont peu stables aux fortes températures et des goûts de cuit et des modifications de la texture peuvent aussi apparaître. Autrement, le traitement thermique idéal est celui qui garantit en même temps la qualité sanitaire et nutritionnelle de l'aliment. Ainsi, la volonté actuelle des conserveurs est de se diriger vers une réduction des barèmes de stérilisation ou pasteurisation pour conserver la qualité finale des produits, mais en maintenant la sécurité microbiologique.

Dans **l'entreprise** marocaine de conserve des olives vertes, le traitement thermique des olives est considéré un point de risque à maîtriser. Ainsi, l'objectif de cet article est de valider le barème de l'appertisation appliqué par la société aux olives vertes et d'évaluer son effet sur la qualité organoleptique et nutritionnelle de ces olives appertisées.

2. Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée dans une entreprise située dans la région Marrakech-Tansift El Hawz. Parmi les activités de la société est l'appertisation des olives vertes. A cet effet, selon la démarche HACCP, le barème thermique de pasteurisation a été identifié comme point critique à maîtriser pour répondre à la fois à la qualité sanitaire et nutritionnelle du produit [5]. Le traitement **conçu** par la société correspond à un palier de température de 90°C pendant environ 20 min .

Les boîtes métalliques contenant les olives sont disposées par couches dans des paniers puis introduites dans un autoclave dont les procédures de mise en route ont été établies. Ainsi, on a **enregistré** l'évolution de la température dans les boîtes qu'on juge dans les zones les plus froides dans l'autoclave ou les points qui présentent les conditions les plus défavorables à la pénétration de la chaleur. Dans les paniers contenant les boîtes des olives, on a déterminé les caractéristiques de transfert de chaleur et on a calculé la valeur stérilisatrice dans chaque boîte, en utilisant des modèles mathématiques (Combinaison des méthodes de Ball et al [6] et de Bigelow [7] citées par Couvert [8]).

Le cycle de pasteurisation dans l'autoclave s'est déroulé en 3 étapes : **Une première étape de montée en température d'environ 20 à 25 min jusqu'à la température de régime de 90°C ; suivi d'une étape de palier de pasteurisation de 20 min à 90°C ; puis une étape de refroidissement de 30 min jusqu'à la température de 34 °C.**

Le suivi de la température dans l'autoclave est réalisé par un enregistreur HITEMP 140 qui **utilise** le logiciel Evidencia Transit pour programmer, démarrer, stopper et télécharger les données à **enregistrer**. Les sondes de contrôle et de l'enregistreur sont à côté du thermomètre à mercure situé au milieu de l'autoclave, au-dessus du niveau des paniers. Les enregistreurs ont été mis dans la boîte située au centre du panier.

2.1. Méthode de calcul

La valeur pasteurisatrice représente le temps théorique de chauffage d'un produit nécessaire, à une température constante de référence ($T_{\text{réf}} = 90^{\circ}\text{C}$, avec $Z=10$) équivalent à la durée des 3 phases (la montée en température, plateau et temps de refroidissement), afin de réduire la charge microbienne dans les proportions voulues.

D'abord, pour des intervalles de temps successifs de durée $t_i = 1$ min, on mesure dans le produit les températures T_i : $T_i = (T_{n-1} + T_n)/2$.

Par la suite, on calcule la valeur de létalité L à la Température T_i pendant une minute :

$$L = 10^{\frac{T_i - 90}{Z}}$$

Z : écart de température permettant de réduire la durée du traitement thermique d'un facteur de 10 pour la même efficacité. La valeur de Z est conventionnellement fixée à dix (en référence à la valeur relative à *Clostridium botulinum*).

Ainsi, pour chaque intervalle de temps $t_i =$ une minute à une température T_i , la valeur pasteurisatrice VP_i est

$$VP_i = t_i \times 10^{\frac{T_i - 90}{Z}}$$

VP_i : valeur pasteurisatrice obtenue à la température T pendant une minute.

Le calcul de la valeur pasteurisatrice **totale**, pour l'ensemble du traitement thermique, se fait par intégration des rectangles de la courbe de mesures de température à l'aide des couples temps/température (Méthode des rectangles de Bigelow [5], selon la formule suivante :

$$VP = \sum VP_i$$

2.2. Méthodes d'analyse nutritionnelle

Les principes des méthodes d'analyse utilisées pour évaluer les **qualités** nutritionnelle et organoleptique sont présentés dans le tableau 1 suivant :

Composés	Méthodes	Références
Teneurs en Protéines	Méthode de Kjeldahl	Pomeranz et Clifton [9]
Teneurs en sucres	Méthode de Bertrand	Browne et Zerban [10]
Teneurs en lipides	Méthode au Soxhlet	Horwitz [11]
Acide gras	Méthode chromatographique Varian 5890	Norme européenne EN ISO 12966-2:2011 [12]
Eau	Etuvage	Horwitz [11]
Teneurs en minéraux	Spectrophotométrie d'absorption atomique (UNICAM 929 AA Spectromètre "ATIUNICAM") sur les filtrats préparés à partir des cendres totales.	Méthode d'Osborne et Voogt [13]
Phosphore	Méthode vanado molybdophosphorique	Chang and Jackson [14]
Teneur en vitamine C	Méthode à l'aide du 2,4- dinitrophenylhydrazine	Sadasivam et Manickham , Benderitter et al., Oboh et al. [15]

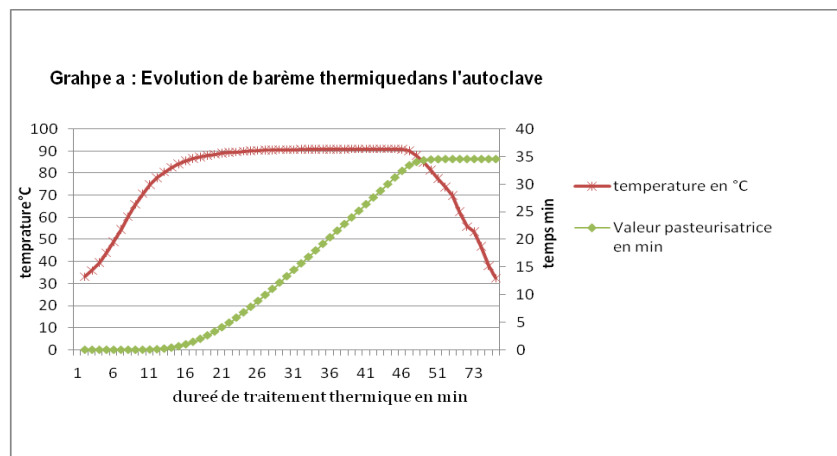
3. Résultats et Discussion

Le traitement thermique pour l'appertisation des olives vertes de table, doit avoir pour but de détruire ou inhiber, d'une part les enzymes et d'autre part les micro-organismes, dont la présence ou la prolifération pourrait altérer ces olives. Il consiste à mettre ces dernières en présence d'un fluide chaud pendant un certain temps puis à les refroidir par la mise en présence d'un fluide froid. Dans ces deux cas, on réalisera un échange de chaleur entre le fluide et le produit à travers la paroi les séparant, du plus chaud vers le plus froid. Cette chaleur devra également migrer au sein du produit.

L'évolution thermique dans le produit résulte des deux phénomènes : a) migration de la chaleur à travers une paroi et b) migration de la chaleur dans le produit soit par convection suite aux mouvements ou déplacements de la matière ou par conduction à travers les échanges entre les parties les plus chaudes et les plus froides.

Ainsi, afin de présenter les différentes phases d'un traitement thermique discontinu classique, et comment celui-ci peut être conçu, contrôlé et validé, il est utile d'en proposer une représentation graphique très usuelle: enregistrement des températures dans l'autoclave au cours du temps de traitement qui sont relevées au point critique du produit dans les 4 paniers. C'est une représentation de barèmes de traitement thermique en coordonnées semi-logarithmiques, avec, en abscisse le temps t, et en ordonnée la température au point critique du produit au temps t [16].

Les graphiques (Figure 1 a, b, c et d) décrivent l'évolution des températures à l'intérieur des boîtes de conserve pendant le cycle de pasteurisation des olives vertes. Elles correspondent aux valeurs des températures à l'intérieur des boîtes de conserve. On peut très bien distinguer les étapes principales. Une phase de « Come Up Time » (CUT) qui consiste à un délai de montée de la température de l'enceinte environ 25 min, jusqu'à la température de régime ($T_r = 90^\circ\text{C}$), suivie d'une phase de palier chaud durant laquelle la température de régime est maintenue constante pendant environ 20 min, puis une phase de « Come Down Time » (CDT) consistant à un refroidissement qui dure environ 30 min.



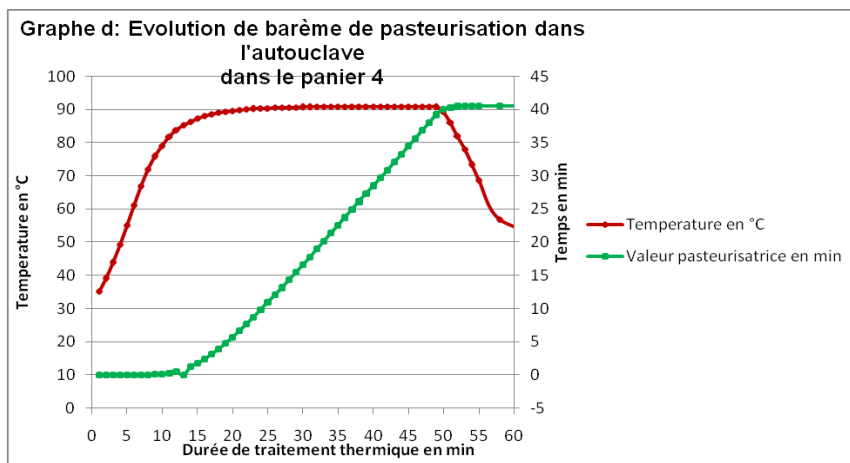
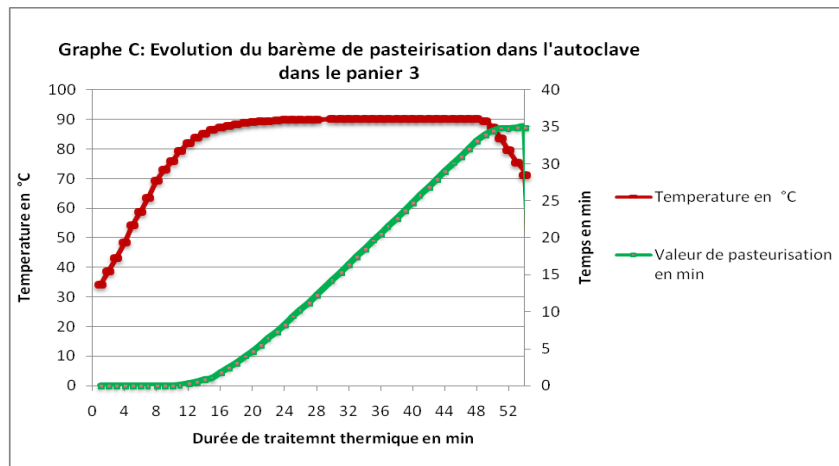
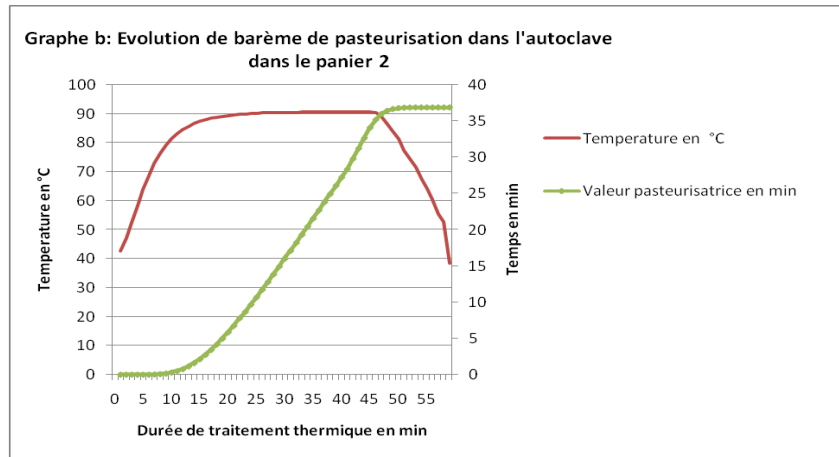


Figure 1 (Graphes a, b, c, d) : Enregistrements de la température au cours du traitement thermique appliqué pour l'appertisation des olives vertes de table dans les 4 paniers

retrouver avec une réduction à 10^{-9} pathogène par boîte, ou plutôt une chance sur un milliard qu'une boîte contienne un pathogène. C'est le risque maximal accepté par la norme de la pasteurisation pour la commercialisation du produit.

Ce barème est choisi en fonction de la nature du produit, son pH, l'emballage, le nombre initial de microorganismes, contenus dans le produit avant pasteurisation, du type d'autoclave employé, du fluide chauffant (eau ou vapeur d'eau) et du délai de mise en régime de l'autoclave [17,18,19].

Ainsi, la conception d'un barème de pasteurisation, combine à la fois :

- La définition de l'objectif d'intensité thermique et d'efficacité décontaminant à atteindre.
- La définition de la zone du produit où ce traitement minimal doit être appliqué : notion de point critique du produit.
- La prise en compte de la vitesse de pénétration de la chaleur dans le produit, influencée elle-même par une éventuelle agitation.
- Le choix de la température de traitement en palier.
- La température initiale du produit.
- Les caractéristiques du matériel (autoclave) mis en œuvre.

Dès que l'on connaît les caractéristiques thermiques du couple produit/emballage et du matériel de traitement thermique, le choix de la température de travail induit une durée de barème nécessaire pour atteindre l'objectif de la valeur pasteurisatrice au point critique. Cette durée de barème peut être déterminée par des méthodes de calculs prédictives (méthode de Ball), par expérimentations successives (méthode de Bigelow ou de Flambert) ou par l'adaptation d'un barème existant en interne et déjà validé pour des conditions de fabrication similaires [20].

Tenant compte par exemple du paramètre pH, dans des produits ayant un pH inférieur à 4,5 (entre 3 et 4) telle la conserve d'olive, les spores des microorganismes ne se développent pas. Tous les fruits, dont le pH varie entre 2 et 4,5, ne contiennent pas de bactéries capables de générer des spores. A l'opposé des légumes, des viandes et des poissons (leur pH varie entre 5 et 7,5), les spores se développent jusqu'à 120°C seulement lorsque leur pH est supérieur à 4,5. Sous cette barrière du 4,5, on considère qu'une température variant entre 80 et 90°C est suffisante pour stériliser et pasteuriser les aliments des micro-organismes à l'exception des levures et moisissures qui se développent sur des produits de pH entre 2 et 10.

Cependant, il est constaté un antagonisme entre le traitement thermique « élevé » nécessaire pour garantir la stabilité du produit et le résultat sensoriel des produits [21,22]. La maîtrise du traitement thermique est donc un paramètre primordial pour garantir les qualités organoleptiques.

Afin de permettre une connaissance de l'effet létal d'un traitement thermique, la notion de Valeur Stérilisatrice (VS) ou pasteurisatrice (VP) a été introduite comme une « échelle d'intensité de traitement thermique ». Par définition, la VP est une durée de traitement thermique, exprimée en minutes, à une température de référence (Tref) qui permet la destruction d'une quantité de micro-organismes cibles dont les caractéristiques de thermorésistance sont connues. En littérature, $F_0 = 30$ min est la valeur pasteurisatrice sanitaire correspond au traitement thermique minimal pour les conserves acides (pH < 4,5) à une température inférieure à 90°C. Ainsi, cette valeur pasteurisatrice devrait être parvenue dans les boîtes de conserve situés dans la zone la plus froide et qui correspond au point critique selon le plan HACCP.

En effet, le point clef dans la conception d'un traitement thermique est la connaissance et la quantification des paramètres décrivant la vitesse de pénétration de chaleur dans la totalité du produit conditionné (au chauffage, puis lors du refroidissement).

Dans le procédé d'appertisation, la chaleur du fluide chauffant, permettant la destruction des microorganismes, est transmise au contenu à travers la paroi du récipient et pénètre plus ou moins vite à l'intérieur du produit jusqu'au point le plus lent à s'échauffer, qui est généralement le centre ou aussi le plus éloigné de la paroi (Figure 2).

Du mode de pénétration de la chaleur dans le produit découle la notion de « point critique » aussi souvent appelé, à tort, « point froid » : il est défini comme la zone du produit qui va recevoir durant le cycle thermique complet (chauffage, puis refroidissement) l'intensité de traitement la plus faible, autrement dit c'est le point du produit pour lequel la valeur pasteurisatrice acquise est la plus faible après traitement. C'est bien entendu dans cette zone que les mesures thermiques doivent être faites pour le suivi des traitements.

Les graphes (a, b, c, d) (Figure 1) représentant de manière graphique et écrite, l'évolution de la température en fonction du temps ainsi que la valeur pasteurisatrice calculé à chaque intervalle du temps t_i . Les sondes

ont été programmées pour qu'elles enregistrent l'évolution toutes les 60 secondes (notre Δt correspond à 1 min). Grâce à ces données, nous avons pu effectuer les calculs nécessaires pour déterminer la valeur pasteurisatrice et les caractéristiques de transferts de chaleur à travers le produit.

Par la suite, après le calcul de la valeur pasteurisatrice F de la boîte de conserve qui se situe au centre de chaque panier, une comparaison est faite entre les valeurs obtenues dans les différents paniers et la valeur pasteurisatrice de référence qui est $F = 30$ min (Figure 2). Ces résultats nous ont permis d'identifier une valeur VP dans tous les paniers supérieure à la valeur pasteurisatrice de référence VP référence de 30. Ceci témoigne de la conformité et de la validité du barème (20 min, T° max 90°C) de traitement thermique des olives vertes et de l'atteinte de la stérilité commerciale [23].

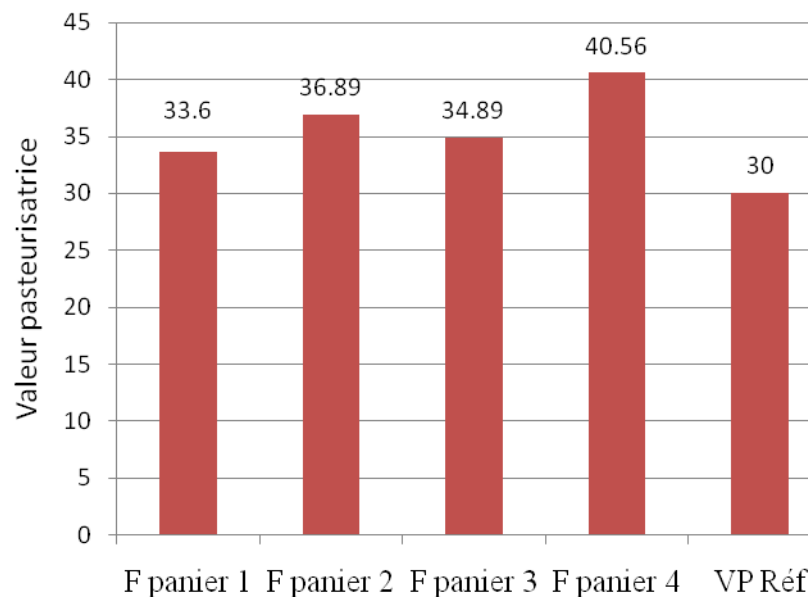


Figure 2 : Comparaison graphique des valeurs pasteurisatrices F des paniers avec la valeur F de référence (VP Réf)

D'un autre part, le test a montré que la distribution de la chaleur dans la totalité de l'autoclave est plus ou moins homogène sauf dans le panier 4 qui présente la zone où la valeur pasteurisatrice VP atteint 40,56. Donc il faut diagnostiquer l'autoclave, déterminer et corriger la cause de cette grande valeur.

En fait, les traitements thermiques à température constante présentent des désavantages, notamment pour les produits à caractère conducteur où la chaleur se propage de proche en proche, et les méthodes d'optimisation de ces traitements présentent des limites [24]. Les barèmes ainsi calculés sont souvent un peu excessifs et sous estiment l'inertie thermique des produits au refroidissement.

D'autre part, les barèmes à palier constant induisent toujours une inutile sur-cuisson périphérique des produits conductifs [25]. Ce sont là les inconvénients des barèmes à température constante, particulièrement ceux calculés par la méthode de Ball [6,8]. Après un traitement thermique à température constante, ces produits présentent une forte hétérogénéité de cuisson entre le centre et la périphérie, affectant ainsi les caractéristiques organoleptiques du produit qui devraient être préservés.

Dans cet objectif, afin de s'assurer de la validité du barème de pasteurisation tout en conservant la qualité nutritionnelle des olives, des paramètres organoleptiques des olives vertes ont été suivis avec d'autres paramètres qui sont susceptibles de révéler une réduction ou un problème sur la qualité nutritionnelle des olives (Tableau 2). Ces contrôles sont réalisés principalement pour la recherche de la relation barème de stérilisation et qualité organoleptique du produit. Le tableau 2 montre bien que les principales composantes nutritionnelles ou organoleptiques qu'on devait vérifier témoignent de **bonnes qualités** nutritionnelle, organoleptique et sanitaire des olives vertes avec le barème de pasteurisation conçue par l'entreprise.

Tableau 2. Analyses des paramètres organoleptiques effectués sur les olives vertes de table

Composition	Quantité	% AJR	Différence moyenne cat.
Valeur énergétique			
<u>Energie - Calories</u>	136 kcal	7%	-27%
<u>Energie - kilojoules</u>	557 kJ		-28%
Protéines	0,97 g	2%	-58%
Alcool	0 g		-100%
Eau	74,8 g		+8%
Glucides	0,54 g	0%	-92%
dont <u>Sucres</u>	0,54 g	1%	-85%
dont <u>Amidon</u>	0 g		-100%
Lipides	13,2 g	19%	-19%
dont Acide Gras saturés	1,75 g		-51%
dont Acide Gras monoinsaturés	9,74 g		+42%
dont Acide Gras polyinsaturés	1,13 g		-77%
Minéraux			
<u>Sodium</u>	1680 mg	70%	+99%
soit équivalence en <u>Sel</u>	4233,6 mg		
<u>Magnésium</u>	19 mg	5%	+4%
<u>Phosphore</u>	10,6 mg	2%	-79%
<u>Potassium</u>	39,3 mg	2%	-75%
<u>Calcium</u>	61 mg	8%	+31%
<u>Manganèse</u>	0,05 mg	2%	-69%
<u>Fer</u>	0,96 mg	7%	+3%
<u>Cuivre</u>	0,21 mg	21%	+79%
<u>Zinc</u>	0,23 mg	2%	-33%
<u>Sélénium</u>	0,9 µg	2%	-58%
<u>Iode</u>	4,5 µg	3%	-66%
Vitamines			
<u>Vitamine A - Beta-Carotène</u>	206 µg	26%	-9%
<u>Vitamine A - Rétinol</u>	0 µg		-100%
<u>Vitamine D</u>	0 µg	0%	-100%
<u>Vitamine E</u>	1,99 mg	17%	-48%
<u>Vitamine C</u>	0 mg	0%	-100%
<u>Vitamine B1</u>	0,021 mg	2%	-60%
<u>Vitamine B2</u>	0,007 mg	0%	-94%
<u>Vitamine B3</u>	0,237 mg	1%	-50%
<u>Vitamine B5</u>	0,023 mg	0%	-87%
<u>Vitamine B6</u>	0,031 mg	2%	-66%
<u>Vitamine B9</u>	4,7 µg	2%	-68%
<u>Vitamine B12</u>	0 µg	0%	-100%

Conclusion

Dans cette étude, afin de déterminer la validité du barème de pasteurisation (choix du couple temps/température du traitement thermique) dans les conserves des olives vertes de table, il faut connaître les variations de température dans le produit au cours du temps. Dans la pratique, on suit la température au point le plus froid du produit appelé « point critique » ou centre des paniers situé à différents endroits.

La validation d'un traitement thermique passe nécessairement par le calcul des valeurs pasteurisatrice VP; En effet le calcul de ces VP dans les quatre paniers montre des valeurs supérieures à la valeur pasteurisatrice de référence, ce qui est témoin bien de la conformité et la validité du barème de traitement thermique des olives vertes appliqué par la société et de l'atteinte de la stérilité commerciale. A l'exception du panier 4, la

VP s'avère excessive et peut affecter les qualités organoleptiques du produit. Des analyses dans ce sens ont été effectuées et ont confirmé que les qualités nutritionnelles et organoleptiques ne sont pas altérées par ce barème d'appertisation tout en assurant la qualité sanitaire des olives vertes. En effet, afin d'optimiser ce traitement thermique en tenant de ces contraintes et ces exigences, d'autres paramètres méritent d'être étudiés à savoir les facteurs liés au produit et à l'emballage ainsi que la maîtrise du cycle de l'autoclavage.

Références (Revoir la mise en forme)

1. Bimbenet J.J., Duquenoy A., Trystram G., *Génie des procédés alimentaires, des bases aux applications*, Paris: ed. Dunod., ISBN 9782100044351(2002) 553.
2. Yahya Rokni, Nabil Ghabbour, Nour-Eddine Chihib, Philippe Thonart, Abdeslam Asehrou , *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (6) (2015) 1740-1751
3. M.L. Ouaziz1, M. Zaaraoua , A. Aboudia , A. Mouabad , A. El Antari., *J. Mater. Environ. Sci.* 7 (11) (2016) 4151-4157
4. Bourgeois C.M., Mescle J.-F., Zucca J., *Microbiologie alimentaire, tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*, 2^e édition, Tec & Doc, Paris, ISBN : 2-7430-0037-6 (1996) 650.
5. Moumene H., Hasib A., Charraoue C., Jaouad A., *Revue de Génie Industriel*, 8 (2012) 93-107
6. Ball, C. O., Olson, F. C. W. *Sterilization in food technology - Theory, Practice and Calculations. First edition, McGraw-Hill Book Company, Inc.* (1957).
7. Bigelow, W. D., *J. Infect. Diseases* 29, (1921) 528-536.
8. Couvert O., *Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale.* (2002) 180.
9. Pomeranz, Y.; Clifton, M.E., *Food Analysis: Theory and Practice. Van Nostrand Reinold*, ISBN: 0442283164 , *New-York, USA.* (1987) 797.
10. Browne, C.A., Zerban, F.W., *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis*, third ed. John Wiley and Sons, (1955) 497-512.
11. Horwitz, W. (Eds.) (2002), "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", International (AOAC), vol. II, 43 Spices and Other Condiments, 43. 1. 02 Color Extractable in Spices. 17th ed. Gaithersburg, Maryland
12. Norme ISO 12966-2 : (2011), *Corps gras d'origines animale et végétale -- Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras -- Partie 2: Préparation des esters méthyliques d'acides gras.*
13. Osborne, D.; Voogt, P. , *Academic Press Inc., London Official Methods* (1978) 6.2- 6.3
14. Chang, S.C., and M. L. Jackson.. *Soil Sci.* 84(1957)133-144
15. Sadasivam S., A. Manickham., *Wiely Estern Ltd., Madras* (1992).
16. Zuber, F., Biton, M, and Cazier A., *Technique de l'Ingénieur*, (2008b) F 2032
17. Santos, M. H. S., Kalasic, H. N., Goti, A. C., Enguidanos, M. R., *Int. J. food microbiol.* 16 (1992) 275-281.
18. Lopez, M., Mazas, M., Gonzalez, I., Bernardo, A., Gonzalez, J., *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 12, (1994) 317-322.
19. Fernandez, P. S., Ocio, M. J., Rodrigo, F., Rodrigo, M., Martinez., *Int. J. Food Microbiol.* , 32 (1996) 225-233.
20. Zuber, F., Biton, M, and Cazier A., *Bases Scientifiques pour la maîtrise des produits appertisés. Techniques de l'Ingénieur*, (2008a) F 2031.
21. Basset V., Le Ba D., Seince J.L., Zuber F., *Information technique du CTCPA* , (1997) 134.
22. Sobczak E., Cordier G., *Information Technique du CTCPA* , 218 (2004).
23. Huang, L., *J. Food Eng.*, 79 (2007) 1166-1171.
24. Magee, T.R.A., *J. Food Eng.*, (1995) 223-232.
25. Banga, J.R, Perez-Martin, R.I. Gallardo, J.M and Casares ., *J. Food Eng.*, 14 (1991) 25-51.

RESUME

Les bactériocines sont des peptides produits par les bactéries lactiques (BL) et ayant une activité antibactérienne. Sept souches de BL ont été isolées et identifiées par des méthodes physiologiques et biochimiques, à partir de lait de vache et de viande hachée de dromadaire. Cette étude a montré que ces souches appartiennent à quatre espèces différentes de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* : *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. yamanashiensis* et *L. salivarius*. Ces sept souches ont été évaluées pour leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de treize germes pathogènes et d'altération. Les résultats de cette étude ont montré que la souche *L. yamanashiensis*, isolée de la viande hachée de dromadaire, possède un pouvoir inhibiteur plus large que celui des autres souches lactiques. En effet, cette souche est capable d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens* et trois espèces de *Salmonella*.

MOTS CLES : lait cru de vache, viande de dromadaire, bactériocine, bactéries lactiques, germes pathogènes.