



HAL
open science

Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique

Lucie Léonard

► **To cite this version:**

Lucie Léonard. Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Autre. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS044 . tel-01228979

HAL Id: tel-01228979

<https://theses.hal.science/tel-01228979v1>

Submitted on 16 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM),
Équipe Procédés Alimentaires et Physico-Chimie (PAPC) (Agrosup Dijon)

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de l'Alimentation

par

Lucie LEONARD

Le 14 novembre 2013

**Évaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries
lactiques confinées dans une matrice polymérique**

Directeurs de thèse

Pr. Rémi SAUREL

Dr. Nadia OULAHAL

Jury

Pr. Pascal DHULSTER, Université Lille 1

Rapporteur

Pr. Ismail FLISS, Université Laval (Québec, Canada)

Rapporteur

Pr. Anne-Marie REVOL-JUNELLES, Université de Lorraine

Présidente et Examinatrice

Dr. Yves WACHE, Agrosup Dijon

Examineur

Pr. Rémi SAUREL, Agrosup Dijon

Directeur de thèse

Dr. Nadia OULAHAL, Université Lyon 1

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires, Équipe Mixte d'Accueil 3733, Université Lyon 1 – ISARA Lyon) et de l'équipe PAPC (Procédés Alimentaires et Physico-Chimie, UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Agrosup Dijon, Université de Bourgogne) grâce aux supports financiers des « Fonds de Développement de la Recherche » du Technopole Alimentec (Bourg-en-Bresse, Ain) et de la région Bourgogne.

Mes plus chaleureux et sincères remerciements vont en tout premier lieu à mes deux directeurs de thèse qui m'ont fait l'honneur de diriger ce travail. Je tiens à remercier Dr. Nadia Oulahal pour sa disponibilité, son écoute, ses précieux conseils, sa rigueur scientifique, et le Pr. Rémi Saurel pour son ouverture d'esprit, ses remarques toujours pertinentes et les opportunités de collaboration qu'il m'a offert.

Je tiens également à remercier Pr. Pascal Degraeve pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour son soutien et nos discussions scientifiques toujours fructueuses.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Pr. Ismail Fliss, Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (Université Laval, Québec, Canada), et au Pr. Pascal Dhulster, Probiogem (Université Lille 1), pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger mon travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Dr. Yves Waché qui a accepté de siéger dans ce jury de thèse et envers Pr. Anne-Marie Revol-Junelles qui en a accepté la présidence.

Je souhaite également remercier Yves Waché (à une deuxième reprise) et Patrice Dole pour avoir participé à mes comités de thèse me permettant de prendre du recul sur mon travail et de faire émerger de nouvelles idées.

J'ai pu rencontrer et collaborer avec de nombreuses personnes au cours de ces trois années, j'espère n'oublier aucune d'elle :

- Merci à tous les membres de l'équipe BioDyMIA pour leur soutien et l'ambiance agréable qui y règne, une pensée particulière à Roselyne (pour m'avoir formé à la rigueur des règles H&S et bien plus), Isabelle (pour avoir toujours eu les yeux de la foi avec mes gels), Émilie et Adem (pour leur aide), Catherine (pour ses encouragements), Amandine (pour nos petites discussions entre deux portes), Sandrine et Zolalaina (pour leur soutien technique et bien plus), Christine (pour les côtés administratifs).

- Merci à tout le personnel enseignant de l'IUT Génie biologique de Bourg-en-Bresse pour les moments partagés au déjeuner et pour m'avoir donné la possibilité d'avoir une expérience en enseignement.
- Merci à tous les membres de l'équipe PAPC qui m'ont accueillie pour ma dernière année de thèse.
- Merci à l'ensemble de l'équipe de la plateforme DIMACELL à l'INRA (Dijon) : Jeannine Lherminier, Aline Bonotte, Élodie Noirot et tout particulièrement Christine Arnould pour m'avoir formée à l'utilisation du microscope confocal et pour toutes ces heures consacrées à mon projets et ses réflexions fructueuses.
- Merci au Pr. Pascal Dhulster pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et au Pr. Naïma Nedjar et à Gabrielle Châtaigne pour leur encadrement.
- Merci à tous mes stagiaires qui ont fait avancé ce projet et que j'espère ne pas avoir trop maltraité : Nassib, Fahima, Nouria, Imen, Thomas, Anaïs, Olfa.
- Merci à toutes les belles rencontres régionales, nationales et internationales de ces trois années : Phuong, Petya, Lamia, Mélanie, Li, Leila, Koi, Manal, Émilie, Fatma, Jean-Luc, Claire, Fadi, Fouzia, Audrey, Bojina, Coralie, Mia, Nga, Attaf, Ashish, Mohamed.

Comme une évidence, je dédicace ce travail à ma famille. Merci à mes parents et à ma sœur pour leur soutien, leur enthousiasme et leur investissement pour la réussite, je l'espère, de mon projet professionnel et de vie.

Enfin, un rayon de soleil tunisien est passé par là et est resté dans mon cœur. Merci pour ta tendresse, ton écoute, tes attentions malgré la distance.

و سوف نسعى إلى بناء حياتنا معاً، إن شاء الله

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XVIII
LISTE DES ANNEXES.....	XIX
LISTE DES VALORISATIONS SCIENTIFIQUES.....	XX

Introduction.....1

CHAPITRE 1 : Étude bibliographique.....7

1.1 Les bactéries lactiques (LAB) bioprotectrices.....	8
1.1.1 Les LAB.....	8
1.1.1.1 Caractéristiques générales.....	8
1.1.1.2 Classification.....	8
1.1.1.3 Métabolisme.....	9
1.1.1.3.1 Métabolisme des carbohydrates.....	9
1.1.1.3.2 Métabolisme de l'azote.....	11
1.1.2 Mécanismes antimicrobiens des LAB bioprotectrices.....	13
1.1.2.1 La compétition nutritionnelle et pour l'espace.....	14
1.1.2.2 La production de métabolites antimicrobiens non peptidiques	15
1.1.2.2.1 Les acides organiques, effet pH.....	15
1.1.2.2.2 Le peroxyde d'hydrogène.....	17
1.1.2.2.3 Le dioxyde de carbone.....	18
1.1.2.2.4 Le diacétyle.....	18
1.1.2.2.5 La reutérine.....	19
1.1.3 Les bactériocines.....	19
1.1.3.1 Classification des bactériocines.....	21
1.1.3.1.1 Classe I : les lantibiotiques.....	22
1.1.3.1.2 Classe II : les non-lantibiotiques.....	23
1.1.3.1.3 Classe III : les protéines à hauts poids moléculaires.....	24
1.1.3.1.4 Classe IV : les bactériocines complexes.....	24
1.1.3.2 Mode d'action des bactériocines.....	24
1.1.3.3 Régulation de la production de bactériocines par le système de « Quorum Sensing ».....	27
1.1.3.4 Conditions optimales de production de bactériocines par des LAB.....	28
1.1.3.5 Utilisation des bactériocines en industrie agroalimentaire.....	32
1.1.4 Mises en évidence des propriétés bioprotectrices des LAB.....	38
1.1.4.1 Le risque <i>Listeria</i> dans le domaine agroalimentaire.....	38
1.1.4.2 Tests antimicrobiens.....	40
1.1.4.3 Méthodes d'identification des métabolites antimicrobiens des LAB.....	42

1.2 Les systèmes d'immobilisation.....	43
1.2.1 Les films secs.....	43
1.2.2 L'encapsulation, une méthode développée dans le domaine des probiotiques et des productions en réacteurs.....	44
1.2.3 Structures à base de mélanges de biopolymères.....	47
1.2.4 Mécanismes physico-chimiques généraux mis en jeu dans l'adhésion bactérienne à une surface : application aux LAB.....	52
1.2.4.1 Relation entre propriétés de surface et interactions.....	52
1.2.4.2 Caractérisation des propriétés de surface des LAB.....	54
1.2.4.2.1 MATS (« Microbial Adhesion To Solvents »).....	54
1.2.4.2.2 Mobilité électrophorétique, mesure du potentiel Zêta.....	55
1.2.5 Localisation des cellules : outils de microscopie.....	56
1.2.5.1 Systèmes polymériques biphasiques et microscopie confocale.....	57
1.2.5.2 Les fluorochromes pour marquer les cellules bactériennes.....	57
1.3 Physico-chimie des systèmes polymériques biphasiques.....	61
1.3.1 Les mélanges de biopolymères.....	61
1.3.1.1 Comportements de phase des systèmes protéine/polyoside/eau.....	61
1.3.1.2 Séparation de phase.....	62
1.3.1.2.1 Aspect thermodynamique.....	62
1.3.1.2.2 Phénomène de déplétion.....	63
1.3.1.2.3 Diagramme de phases.....	65
1.3.1.2.4 Aspect cinétique.....	66
1.3.1.2.5 Méthodes analytiques de caractérisation des séparations de phase.....	67
1.3.2 Les biopolymères étudiés.....	68
1.3.2.1 L'alginate de sodium.....	68
1.3.2.1.1 Description générale.....	68
1.3.2.1.2 Mécanisme de gélification.....	70
1.3.2.2 Les caséinates de sodium.....	71
1.3.3 Les mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium.....	72
1.3.3.1 Comportement de phase des systèmes alginate de sodium/caséinate de sodium.....	72
1.3.3.2 Gel mixte.....	74
1.4 Conclusion.....	75
1.4.1 Bilan de l'état de l'art.....	75
1.4.2 Approche méthodologique.....	77

CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes.....79

2.1 Microorganismes testés, milieux et conditions de croissance.....	80
2.1.1 Souches bioprotectrices : bactéries lactiques (LAB).....	80
2.1.2 Souches cibles.....	81
2.1.3 Caractérisation des propriétés de surface de cellules de bactéries lactiques : méthode MATS (« Microbial Adhesion To Solvents »).....	82

2.1.3.1 Protocole.....	82
2.1.3.2 Interprétation.....	83
2.1.4 Mesure du potentiel Zêta.....	84
2.2 Le système biphasique alginate/caséinate.....	85
2.2.1 Caractérisation des poudres.....	85
2.2.1.1 Détermination de la matière sèche.....	85
2.2.1.2 Détermination du taux de cendres.....	85
2.2.1.3 Taux de protéines.....	86
2.2.1.4 Courbe de solubilité des caséinates de sodium en fonction du pH.....	86
2.2.1.5 Analyse RMN ¹ H de l'alginate.....	87
2.2.2 Préparation des solutions mères.....	88
2.2.3 Diagrammes de phases.....	88
2.2.3.1 Détermination du diagramme de phases par observation macroscopique.....	88
2.2.3.2 Diagramme de phases à pH = 7.....	88
2.2.3.3 Influence du pH sur l'allure du diagramme de phases.....	89
2.2.4 Étude du déphasage, analyse de diffusion multiple de la lumière.....	90
2.2.4.1 Principe.....	90
2.2.4.2 Mesure.....	91
2.2.5 Mesure du potentiel Zêta des solutions mère d'alginate de sodium et de caséinate de sodium.....	91
2.3 Préparation des échantillons à tester pour leur activité antimicrobienne.....	92
2.3.1 Solution de nisine, témoin positif.....	93
2.3.2 Préparation des surnageants de cultures bactériennes de LAB.....	93
2.3.3 Préparation des matrices alginate, caséinate et alginate/caséinate.....	94
2.3.3.1 Matrices liquides.....	94
2.3.3.1.1 Matrices incorporant les surnageants de LAB.....	95
2.3.3.1.2 Matrices incorporant les cellules de LAB.....	95
2.3.3.2 Matrices gélifiées.....	96
2.3.3.2.1 Gélification sous forme de billes.....	96
2.3.3.2.2 Gélification sous forme de gels plans.....	97
2.4 Tests antimicrobiens pour l'évaluation des capacités bioprotectrices des différentes souches de LAB (solutions libres et matrices polymériques (liquides et gélifiées)).....	98
2.4.1 Méthode de diffusion en puits en milieu gélosé, échantillons liquides.....	98
2.4.2 Méthode de diffusion entre deux couches de milieu gélosé, échantillons gélifiés.....	99
2.5 Confinement des cellules de LAB dans les matrices polymériques pour une production <i>in situ</i> des métabolites anti-<i>Listeria</i>.....	99
2.5.1 Suivi de la viabilité par dénombrement.....	100
2.5.2 Tests antimicrobiens pour l'évaluation des capacités bioprotectrices des cellules de LAB incorporées dans les matrices polymériques liquides et gélifiées.....	101
2.6 Étude microscopique.....	102

2.6.1 Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL).....	102
2.6.1.1 Principe.....	102
2.6.1.2 Marquage des caséinates.....	103
2.6.1.3 Marquage des cellules de LAB.....	104
2.6.1.4 Préparation des échantillons gélifiés.....	104
2.6.1.5 Observations.....	105
2.6.1.6 Traitements des images.....	105
2.6.2 Microscopie Électronique à Balayage (MEB).....	106
2.6.2.1 Principe.....	106
2.6.2.2 Préparation des échantillons et observations.....	107
2.7 Caractérisation des métabolites antimicrobiens responsables de l'activité bioprotectrice	108
2.7.1 Neutralisation, traitements enzymatiques et thermiques des surnageants.....	108
2.7.2 Dosage de l'acide lactique.....	109
2.7.3 Purification partielle de « BLS » (« Bacteriocin Like Substance »).....	109
2.7.3.1 Purification partielle de « BLS ».....	110
2.7.3.2 Analyse électrophorétique : Tricine-Page.....	111
2.7.4 Analyse Dot-Blot.....	113
2.7.4.1 Principe.....	113
2.7.4.2 Protocole.....	114
2.7.5 Identification de peptides antimicrobiens par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (SM).....	115
2.8 Analyses statistiques.....	115

CHAPITRE 3 : Sélection des souches de LAB d'intérêt et caractérisation des métabolites antimicrobiens produits par les principales souches sélectionnées.116

3.1 Activité antimicrobienne des LAB vis-à-vis des souches cibles de <i>Listeria</i>.....	117
3.1.1 Recherche des conditions optimales pour l'activité antimicrobienne.....	117
3.1.1.1 Influence de la température d'incubation sur l'activité antimicrobienne.....	117
3.1.1.2 Activité antimicrobienne des surnageants de culture en fonction du temps de prélèvements au cours de la culture.....	119
3.1.2 Activité des cultures et des surnageants de culture de 19 souches de LAB en milieu gélifié contre trois souches de <i>Listeria</i>	124
3.2 Pré-caractérisation des métabolites antimicrobiens responsables de l'activité de <i>Lactobacillus paracasei</i> LAB1 et LAB2.....	129
3.2.1 Activité anti- <i>Listeria</i> des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après neutralisation	130
3.2.2 Activité anti- <i>Listeria</i> des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après traitement à la catalase.....	130
3.2.3 Activité anti- <i>Listeria</i> des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après traitements avec des enzymes protéolytiques.....	132

3.2.4 Activité anti- <i>Listeria</i> des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après traitements thermiques.....	132
---	-----

3.3 Pré-Caractérisation des métabolites antimicrobiens responsables de l'activité de *Lactococcus lactis* LAB3.....134

3.3.1 Production d'acide lactique.....	134
3.3.2 Neutralisation, traitements enzymatiques et thermiques des surnageants.....	136
3.3.3 Purification et caractérisation du (des) peptide(s) antimicrobien(s) produit par LAB3.....	138
3.3.3.1 Séparation des composés peptidiques du surnageant de culture de LAB3 par chromatographie d'exclusion et activité antimicrobienne résultante.....	138
3.3.3.2 Analyse électrophorétique.....	141
3.3.3.3 Analyse HPLC-Spectrométrie de Masse.....	142
3.3.3.4 Essai d'immunodétection de la nisine par dot-blot.....	144

3.4 Conclusion.....145

CHAPITRE 4 : Formulation et caractérisation des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium liquides et gélifiés.....147

4.1 Caractérisation de l'alginate de sodium et des caséinates de sodium.....148

4.1.1 Composition des poudres.....	148
4.1.2 Analyse RMN ¹ H de l'alginate.....	149
4.1.3 Mesure du potentiel Zêta.....	150

4.2 Comportement des mélanges.....151

4.2.1 Diagramme de phases partiel obtenu par observation macroscopique à pH = 7 et 25°C.....	151
4.2.2 Influence du pH sur le comportement des mélanges.....	153
4.2.3 Influence de l'ajout de MRS _b	156

4.3 Étude des microstructures.....161

4.3.1 Systèmes liquides.....	161
4.3.1.1 Microstructures et évolution cinétique.....	161
4.3.1.2 Choix de la formulation de travail et influence du MRS _b sur la microstructure.....	164
4.3.1.3 Localisation des cellules de LAB.....	167
4.3.1.3.1 Caractéristiques physico-chimiques des souches de LAB d'intérêts.....	167
4.3.1.3.2 Localisation des cellules de LAB dans les systèmes polymériques liquides.....	170
4.3.2 Systèmes gélifiés sous forme de billes.....	172
4.3.2.1 Réseau d'alginate et gel mixte.....	173
4.3.2.2 Localisation des cellules dans les systèmes polymériques gélifiés (sous forme de billes).....	176

4.4 Conclusion.....180

CHAPITRE 5 : Évaluation de l'activité antimicrobienne des matrices polymériques, supports des actifs antimicrobiens produits *ex situ* et *in situ*.....182

5.1 Activité antimicrobienne des matrices polymériques liquides, supports des actifs antimicrobiens produits <i>ex situ</i> et <i>in situ</i>.....	183
5.1.1 Évaluation de l'effet des cultures des souches de LAB sélectionnées dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate liquides sur le développement de <i>Listeria</i> spp., production des actifs antimicrobiens <i>in situ</i>	183
5.1.1.1 Suivi de la cultivabilité et de l'activité anti- <i>Listeria</i>	183
5.1.1.1.1 Souche bioprotectrice : <i>Lactococcus lactis</i> LAB3.....	183
5.1.1.1.2 Souches bioprotectrices : <i>Lactobacillus paracasei</i> LAB1 et LAB2.....	188
5.1.1.2 Libération des actifs antimicrobiens en fonction du temps.....	196
5.1.1.3 Suivi de la microstructure des matrices polymériques alginate/caséinate et de la répartition des cellules dans les phases alginique et protéique.....	199
5.1.2 Libération des actifs antimicrobiens : activité anti- <i>Listeria</i> des surnageants de culture des souches de LAB sélectionnées incorporés dans les matrices d'alginate, de caséinate et d'alginate/caséinate liquides, production des actifs antimicrobiens <i>ex situ</i>	203
5.1.2.1 Activité antimicrobienne des matrices liquides d'alginate et d'alginate/caséinate incorporant des surnageants de culture de <i>Lactococcus lactis</i> LAB3 récupérés à différents temps de culture.....	204
5.1.2.2 Comparaison des activités antimicrobiennes des matrices liquides d'alginate, de caséinate et d'alginate/caséinate incorporant des surnageants de culture de trois souches de LAB.....	206
5.2 Activité antimicrobienne des matrices polymériques gélifiées, supports des actifs antimicrobiens produits <i>ex situ</i> et <i>in situ</i>.....	209
5.2.1 Activité anti- <i>Listeria</i> des surnageants de culture des souches de LAB sélectionnées incorporés dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate gélifiées, production des actifs antimicrobiens <i>ex situ</i>	209
5.2.2 Évaluation de l'effet des cultures des souches de LAB sélectionnées dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate gélifiées sur le développement de <i>Listeria innocua</i> , production des actifs antimicrobiens <i>in situ</i>	213
5.2.2.1 Gélification sous forme de billes.....	213
5.2.2.1.1 Confinement des cellules de <i>Lactococcus lactis</i> LAB3 : suivi de la cultivabilité et de l'activité anti- <i>Listeria</i>	213
5.2.2.1.2 Confinement des cellules de <i>Lactobacillus paracasei</i> LAB1 et LAB2 : suivi de la cultivabilité et de l'activité anti- <i>Listeria</i>	217
5.2.2.1.2.1 Cultivabilité.....	217
5.2.2.1.2.2 Activité anti- <i>Listeria</i>	221
5.2.2.1.2.3 Libération des actifs antimicrobiens en fonction du temps.....	222
5.2.2.2 Gélification sous forme de gels plans : confinement des cellules de <i>Lactococcus lactis</i> LAB3 : suivi de la cultivabilité et de l'activité anti- <i>Listeria</i>	224
5.3 Conclusion.....	227

<u>Conclusion générale et perspectives.....</u>	229
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	236
ANNEXES.....	261
RÉSUMÉ/ABSTRACT.....	295

LISTE DES FIGURES

Figures du « CHAPITRE 1 : Étude bibliographique »

- Figure 1.1** Représentation schématique des deux voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (d'après Kandler, 1983)..... **11**
- Figure 1.2** Modèle du système protéolytique chez *Lactococcus lactis* (d'après Salminen et Von Wright, 2009)..... **12**
- Figure 1.3** Séquence protéique et structure d'un lantibiotique de type A (la nisine), B (la Mersacidine), de la lacticine 481 (McAuliffe *et al.*, 2001)..... **23**
- Figure 1.4** Mode d'action d'un exemple de lantibiotique, la nisine (Cotter *et al.*, 2005)..... **25**
- Figure 1.5** Mode d'action d'une bactériocine non-lantibiotique de la classe IIa, la Sakacine (Cotter *et al.*, 2005)..... **26**
- Figure 1.6** Mode d'action d'une bactériocine de la classe III, l'Entérolysine A (Cotter *et al.*, 2005)..... **26**
- Figure 1.7 Partie A** : Cluster de gènes impliqués dans la synthèse de la nisine chez *Lactococcus lactis* / **Partie B** : Modèle décrivant la synthèse et la régulation de la nisine chez *Lactococcus lactis* (d'après Kuipers *et al.*, 1995)..... **31**
- Figure 1.8** Vue schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif et intérêts des traitements multiples pour combattre les bactéries pathogènes à Gram négatif (d'après Helander *et al.*, 1997)... **37**
- Figure 1.9** Résultats d'inhibition de différentes souches antagonistes par un test en milieu gélosé de diffusion en spots (dépôt des cultures entières) (d'après Hartmann *et al.*, 2011)..... **41**
- Figure 1.10** Stratégies (A) pour une purification partielle de bactériocine ou (B) menant jusqu'au séquençage (d'après Boris *et al.*, 2001 ; Héquet *et al.*, 2007 ; Da Silva Malheiros *et al.*, 2012).... **43**
- Figure 1.11** Comportements des mélanges de biopolymères protéine/polyoside (d'après Matalanis *et al.*, 2011)..... **48**
- Figure 1.12** Exemple de structures pouvant être formées par des systèmes bipolymériques (d'après Matalanis *et al.*, 2011)..... **49**
- Figure 1.13** Représentation schématique de particule obtenue après pulvérisation-séchage d'un système incompatible confinant du matériel biologique (d'après Millqvist-Fureby *et al.*, 2000).... **51**
- Figure 1.14** Images de microscopie confocale de mélanges caséinate de sodium (SC) / κ -carraghénane (KC) dans NaCl à 0,1 mol.L⁻¹ (Nono *et al.*, 2011)..... **57**
- Figure 1.15 a.** Mode de fonctionnement des deux fluorochromes du kit Live/Dead® BacLight™ / **b.** Viabilité d'une culture de *Lactococcus lactis* LAB3 (starter commercial MD089, Ezal line, Rhône Poulenc, Dangé Saint-Romain, France) dans MRS en anaérobiose à 24 h en utilisant le kit Live/Dead® BacLight™, objectif 100, microscope à épifluorescence Axiovert25 (Zeiss)..... **59**
- Figure 1.16** Exemples de marquage cellulaire par le kit Live/Dead® BacLight™ dans des systèmes dispersés complexes (d'après Auty *et al.*, 2001 ; Shima *et al.*, 2006)..... **60**
- Figure 1.17** Représentation schématique de l'interaction de déplétion entre deux particules (de diamètre σ_c) de protéine globulaire immergées dans une solution de polymère (diamètre σ_p) (d'après De Kruif et Tuinier, 2001)..... **64**

Figure 1.18 Représentation schématique d'un diagramme de phases d'un mélange ségrégatif d'un polymère P1 et d'un polymère P2 (Donato, 2004).....	65
Figure 1.19 Représentation schématique du mécanisme de décomposition spinodale (a) et de nucléation et croissance (b).....	67
Figure 1.20 Structure de l'alginate, bloc hétéropolymérique (d'après Soma <i>et al.</i> , 2009).....	69
Figure 1.21 Représentation schématique de l'association boîte à œufs des séquences poly-L-guluronates de l'alginate réticulé par des ions calcium (d'après Li <i>et al.</i> , 2007).....	70
Figure 1.22 Diagrammes de phases issus de la littérature du système aqueux alginate de sodium/caséinate de sodium.....	73
Figure 1.23 Approche méthodologique mise en œuvre dans la présente étude.....	78

Figures du « CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes »

Figure 2.1 Schéma du protocole expérimental de la méthode MATS (Chadeau, 2010).....	83
Figure 2.2 Principe de mesure du potentiel Zêta.....	84
Figure 2.3 Principe de la mesure de diffusion multiple de la lumière avec le Turbiscan™ (Formulation, France) (d'après Chauvierre <i>et al.</i> , 2004).....	91
Figure 2.4 Présentation synthétique des différents types d'échantillons testés pour leurs propriétés antimicrobiennes.....	93
Figure 2.5 Illustration du protocole de fabrication de gel plan d'alginate et d'alginate-caséinate...97	97
Figure 2.6 Exemple d'un gel d'alginate 1,5 % (m/m), caséinate 4 % (m/m) et 20 % (m/m) MRS _m ...97	97
Figure 2.7 Suivi de la viabilité par mesure de la cultivabilité des cellules de LAB confinées dans les matrices biopolymériques liquides et gélifiées.....	101
Figure 2.8 Suivi de l'activité anti- <i>Listeria</i> des cultures de LAB confinées dans des matrices gélifiées et non gélifiées d'alginate et d'alginate/caséinate.....	102
Figure 2.9 Principe de fonctionnement d'un MCBL (d'après Paddock, 2000).....	103
Figure 2.10 Principe de fonctionnement d'un Microscope Électronique à Balayage.....	107
Figure 2.11 Principe de la méthode dot-blot d'immunodétection.....	113

Figures du « CHAPITRE 3 : Sélection des souches de LAB d'intérêt et caractérisation des métabolites antimicrobiens produits par les principales souches sélectionnées »

Figure 3.1 Activité antimicrobienne (diamètres des zones d'inhibition) des surnageants de culture de <i>Lactococcus lactis</i> LAB3 à 30°C en anaérobiose dans MRS _b contre deux souches de <i>Listeria</i> (<i>L. innocua</i> LRGIA01 et <i>L. monocytogenes</i> S162) en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits (n=3).....	120
Figure 3.2 Illustration du graphique (ii) de la figure 3.1. : Activité antimicrobienne des surnageants de culture de <i>Lactococcus lactis</i> LAB3 à 30°C en anaérobiose dans MRS _b contre <i>L. monocytogenes</i> S162 en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits.....	120

Figure 3.3 Activité anti- <i>Listeria</i> (diamètres des zones d'inhibition) du surnageant de LAB3 récolté après 24h de culture dans MRS en anaérobiose en fonction du pH par la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé (n=3).....	122
Figure 3.4 Diamètres des zones d'inhibition relevées lors de l'action de la nisine préparée à différentes concentrations sur <i>Listeria innocua</i> LRGIA01, <i>innocua</i> ATCC 33090 et <i>monocytogenes</i> S162, et <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé (n=3).....	128
Figure 3.5 Activité anti- <i>Listeria innocua</i> LRGIA01 et ATCC 33090 (diamètres des zones d'inhibition) du surnageant de culture des souches de <i>Lactobacillus paracasei</i> LAB1 et LAB2 natif, neutralisé, traité avec des enzymes protéolytiques et traité thermiquement en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits (n=3).....	131
Figure 3.6 Courbe de croissance et de production d'acide lactique (formes D et L) de la souche LAB3 dans MRS à 30°C en anaérobiose (n=3).....	135
Figure 3.7 Activité anti- <i>Listeria innocua</i> LRGIA01 (diamètres des zones d'inhibition) du surnageant de LAB3 et d'une solution de nisine neutralisés, traités avec des enzymes protéolytiques et traités thermiquement en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits (n=3).....	137
Figure 3.8 Chromatogramme obtenu par séparation à partir d'une colonne de chromatographie d'exclusion (gel Sephadex) d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 précipité au sulfate d'ammonium.....	139
Figure 3.9 Activité anti- <i>Listeria innocua</i> LRGIA01 (diamètres des zones d'inhibition) par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé des 6 pools de fractions recueillis après la chromatographie d'exclusion d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium (n=3).....	140
Figure 3.10 Activité anti- <i>Listeria innocua</i> LRGIA01 (diamètres des zones d'inhibition) par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé des pools 2-3-4 (neutralisés, traités par des enzymes et thermiquement) formés à partir des fractions recueillies après la chromatographie d'exclusion d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium (n=3) / Comparaison avec une solution de nisine à 1500 UI.mL ⁻¹	141
Figure 3.11 Gel d'électrophorèse Tricine-SDS-Page révélant la présence de composés peptidiques dans les pools de fractions obtenus par chromatographie d'exclusion d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium.....	142
Figure 3.12 Chromatogramme d'HPLC de l'échantillon pool 3 (détection à 215 nm).....	144
Figure 3.13 Détection de la nisine par dot blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la nisine A et détection par colorimétrie.....	145
Figures du « CHAPITRE 4 : Formulation et caractérisation des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium liquides et gélifiés »	
Figure 4.1 Profil de solubilité (solubilité de l'azote, « Nitrogen Solubility Index » (NSI)) des caséinates de sodium dans l'eau en fonction du pH pour une suspension à 0,5 % (m/m) à 25°C.....	148
Figure 4.2 Spectre RMN ¹ H dans D ₂ O à 90°C de l'alginate de sodium (Fisher Scientific, Hampton, Hampshire, États-Unis) pré-hydrolysé.....	150
Figure 4.3 Potentiel Zêta d'une solution de caséinate de sodium (à 0,001 % (m/m)) et d'une solution d'alginate de sodium (à 0,005 % (m/m)) en fonction du pH dans un tampon imidazole/acétate à 5 mmol.L ⁻¹ à 25°C (n=3).....	151

- Figure 4.4** Diagramme de phases visuel du système alginate de sodium / caséinate de sodium à pH = 7 (+ séparation de phase, • mélange monophasique), à 25°C.....152
- Figure 4.5** Diagramme de phases des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium à pH = 7,0 (a), 6,0 (b) et 5,5 (c), à 25°C.....155
- Figure 4.6** Activité antimicrobienne anti-*Listeria innocua* LRGIA01 et cultivabilité des cellules de LAB3 (charge initiale en LAB3 : C2, 10^4 UFC.mL⁻¹ de mélange polymérique ; stockage 8 jours à 30°C) confinées dans : (a) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) liquide avec ou sans MRS_b (20 % (m/m)) ; (b) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) + caséinate de sodium (4 % (m/m)) liquide avec ou sans MRS_b (20 % (m/m)) ; (c) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) gélifié (billes) avec ou sans MRS_b (20 % (m/m)) ; (d) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) + caséinate de sodium (4 % (m/m)) gélifié (billes) avec ou sans MRS_b (20 % (m/m)).....157
- Figure 4.7** Influence de l'ajout de MRS_b sur l'équilibre des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium d'un point de vue macroscopique : profils de rétrodiffusion (R) sur 24 h à 25°C en diffusion multiple de la lumière (Turbiscan™) du mélange (a) 1,5 % (m/m) alginate de sodium + 4 % (m/m) caséinate de sodium ; (b) 1,5 % (m/m) alginate de sodium + 4 % (m/m) caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.....159
- Figure 4.8** Microstructures des mélanges aqueux alginate de sodium/caséinate de sodium obtenues par microscopie confocale à pH = 7 à température ambiante. Les zones claires correspondent aux zones riches en caséinate marquées à la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC).....163-164
- Figure 4.9** Mélange aqueux biphasique à 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium (a : mélange ; b : phase riche en caséinate ; c : phase riche en alginate). Les zones claires correspondent aux zones riches en caséinate marquées à la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC).....165
- Figure 4.10** Microstructures et distributions en taille (en μm^2) des microgouttelettes des mélanges aqueux biphasiques à 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium (a, a') et 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % (m/m) MRS_b (b, b'). Les zones claires correspondent aux zones riches en caséinate marquées à la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC).....166
- Figure 4.11** Affinité des cellules de LAB1, LAB2, LAB3 vis-à-vis de quatre solvants d'après la méthode MATS (« Microbial Adhesion To Solvents ») (n=3).....168
- Figure 4.12** Potentiel Zêta d'une suspension de cellules de LAB1, LAB2, LAB3 (8.10^6 UFC.mL⁻¹) en fonction du pH dans un tampon imidazole/acétate à 5 mmol.L⁻¹ (n=3).....170
- Figure 4.13** Localisation des cellules de LAB1, LAB2, LAB3 dans les matrices liquides alginate de sodium / caséinate de sodium / MRS (1,5/4/20 % (m/m)).....171
- Figure 4.14** Observations microscopiques des billes d'alginate et d'alginate/caséinate (composition donnée en % (m/m)).....174
- Figure 4.15** Observations microscopiques des billes d'alginate et d'alginate/caséinate (composition donnée en % (m/m)) en présence de cellules de LAB3 incorporées à C1 (10^{5-6} UFC/bille).....177
- Figure 4.16** Observations microscopiques des billes d'alginate et d'alginate/caséinate (composition donnée en % (m/m)) en présence de cellule de LAB3 incorporées à C3 (10^{7-8} UFC/bille).....178

Figures du « CHAPITRE 5 : Évaluation de l'activité antimicrobienne des matrices polymériques, supports des actifs antimicrobiens produits ex situ et in situ »

- Figure 5.1** Cultivabilité des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 incorporées dans les matrices polymériques liquides stockées à 30°C pendant 12 jours.....184
- Figure 5.2** Zones d'inhibition (Zi (mm)) formées par les matrices polymériques liquides incorporant des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria monocytogenes* S162 et *Listeria innocua* LRGIA01 mesurées par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h).....187
- Figure 5.3** Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB1 incorporées dans les matrices polymériques liquides stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé189
- Figure 5.4** Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB2 incorporées dans les matrices polymériques liquides stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé190
- Figure 5.5** Libération des actifs antimicrobiens des matrices polymériques liquides (chargée initialement avec C1) contenant des cellules de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 vers la gélose : mesure des diamètres des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation des boîtes test vis-à-vis de deux souches de *Listeria innocua* (n=3).....197
- Figure 5.6** Observations microscopiques en MCBL des cellules de LAB (marquées par le kit BacLight Live/Dead®) dans les matrices alg/cas liquides stockées 12 jours à 30°C.....199
- Figure 5.7** Répartition des cellules de LAB dans la phase alginate et protéique des mélanges alg/cas stockés 12 jours à 30°C et comparaison cultivabilité/viabilité.....201
- Figure 5.8** Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01, *innocua* ATCC 33090 et *monocytogenes* S162 des surnageants de culture (neutralisés et non (SN et S)) de 3 souches de LAB incorporés à 20 % (m/m) dans les matrices polymériques par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé (n=3).207
- Figure 5.9** Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 et *innocua* ATCC 33090 des surnageants de culture (neutralisé et non (SN et S)) de 3 souches de LAB incorporés à 20 % (m/m) dans les matrices polymériques par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3).....211
- Figure 5.10** Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactococcus lactis* LAB3 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé214
- Figure 5.11** Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB1 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.....219
- Figure 5.12** Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB2 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) stockées à 30°C pendant

12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24 h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.....220

Figure 5.13 Libération des actifs antimicrobiens des matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) (chargée initialement avec C1) contenant des cellules de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 vers la gélose : mesure des diamètres des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation des boîtes test vis-à-vis de deux souches de *Listeria innocua* (n=3).....223

Figure 5.14 Boîte test de l'activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 en milieu gélosé des gels plans d'alg et d'alg/cas incorporant des cellules bioprotectrices de LAB3, 6 jours après leur incorporation, stockage à 30°C.....225

Figure 5.15 Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactococcus lactis* LAB3 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de gels plans) stockées à 4 ou 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24 h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.....226

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux du « *CHAPITRE 1 : Étude bibliographique* »

Tableau 1.1 Familles et principaux genres des bactéries lactiques (Brenner <i>et al.</i> , 2005).....	9
Tableau 1.2 Type de fermentation et produits majoritaires en fonction du genre de LAB (Kandler, 1983).....	10
Tableau 1.3 Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les bactéries lactiques (Suskovic <i>et al.</i> , 2010).....	14
Tableau 1.4 Quelques bactériocines produites par les LAB (Charlier <i>et al.</i> , 2009 ; Reis <i>et al.</i> , 2012).....	21
Tableau 1.5 Classification des bactériocines (d'après Reis <i>et al.</i> , 2012).....	22
Tableau 1.6 Composition du milieu MRS (Biokar, France).....	29
Tableau 1.7 Application des bactériocines comme conservateurs alimentaires.....	35
Tableau 1.8 Encapsulation de bactéries probiotiques.....	45
Tableau 1.9 Encapsulation de LAB pour une utilisation en bioréacteur.....	46
Tableau 1.10 Incorporation de microorganismes dans des systèmes incompatibles.....	50
Tableau 1.11 Microencapsulation de souches probiotiques confinées dans des systèmes incompatibles.....	51
Tableau 1.12 Principaux paramètres influençant les interactions des microorganismes avec leur environnement.....	52
Tableau 1.13 Caractéristiques énergétiques (mJ.m^{-2}) des solvants utilisés pour la méthode MATS selon Bellon-Fontaine <i>et al.</i> , 1996 avec $\gamma_{\text{L}}^{\text{LW}}$ composante de Lifshitz Van Der Waals, γ_{L}^{+} composante électron-accepteur et γ_{L} composante électron-donneur.....	54
Tableau 1.14 Valeurs de quelques pI de LAB.....	56
Tableau 1.15 Caractéristiques des fluorochromes les plus couramment utilisés pour marquer les acides nucléiques et étudier l'intégrité cellulaire.....	58

Tableaux du « *CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes* »

Tableau 2.1 Référence des souches de LAB étudiées.....	80
Tableau 2.2 Principales caractéristiques et origines des souches bactériennes cibles.....	81
Tableau 2.3 Caractéristiques de la poudre de caséinate de sodium Acros Organics (Geel, Belgique) d'après la fiche technique transmise par le fournisseur. (<i>Les pourcentages sont exprimés en m/m.</i>).....	85
Tableau 2.4 Tableau de composition des mélanges caséinate/alginate choisis pour réaliser le diagramme de phases.....	89
Tableau 2.5 Exemples de compositions de matrices liquides alginate/MRS _b , caséinate/MRS _b , alginate/caséinate/MRS _b de 2,5 g contenant les cellules de LAB (T, témoin sans cellules).....	96
Tableau 2.6 Gradient utilisé pour la séparation du pool 3 par HPLC.....	115

Tableaux du « CHAPITRE 3 : Sélection des souches de LAB d'intérêt et caractérisation des métabolites antimicrobiens produits par les principales souches sélectionnées »

Tableau 3.1 Activité antimicrobienne de surnageants de culture natifs ou neutralisés récoltés dans différentes conditions de température.....**118**

Tableau 3.2 Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01, ATCC 33090 et *monocytogenes* S162 (diamètres des zones d'inhibition) des surnageants de culture (neutralisés (SN) ou non (S)) et des cultures entières (C) de 19 LAB par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé.....**125**

Tableau du « CHAPITRE 4 : Formulation et caractérisation des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium liquides et gélifiés »

Tableau 4.1 Vitesse de déphasage par sédimentation de la phase protéique pour différents mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium avec ou sans MRS_b obtenu d'après les profils de rétrodiffusion en diffusion multiple de la lumière (TurbiscanTM).....**160**

Tableau du « CHAPITRE 5 : Évaluation de l'activité antimicrobienne des matrices polymériques, supports des actifs antimicrobiens produits ex situ et in situ »

Tableau 5.1 Activité antimicrobienne contre *Listeria innocua* LRGIA01 et *Listeria monocytogenes* S162 des matrices liquides incorporant des surnageants de culture de *Lactococcus lactis* LAB3.....**205**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<p>aa : Acide Aminé</p> <p>ADN : Acide DésoxyriboNucléique</p> <p>Alg : alginate de sodium</p> <p>Arg : Arginine</p> <p>ATCC : « American Type Culture Collection »</p> <p>ATPS : « aqueous two-phase system »</p> <p>a_w : activité de l'eau</p> <p>« BLS » : « Bacteriocin Like Substance »</p> <p>CaCl₂ : Chlorure de calcium</p> <p>Cas : caséinate de sodium</p> <p>C₂H₄O₂ : acide acétique</p> <p>C₃H₆O₃ : acide lactique</p> <p>CMI : Concentration Minimale Inhibitrice</p> <p>CO₂ : dioxyde de carbone</p> <p>DO : Densité Optique</p> <p>EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique</p> <p>« FDA » : « Food and Drug Administration »</p> <p>G : unité guluronique de l'alginate</p> <p>« GRAS » : « Generally Recognized As Safe »</p> <p>HCl : acide chlorhydrique</p> <p>HPLC : « High Performance Liquid Chromatography »</p> <p>HPMC : hydroxypropylmethylcellulose</p> <p>H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène</p> <p>IP : iodure de propidium</p> <p>LAB : bactérie lactique (« Lactic Acid Bacteria »)</p> <p>Leu : Leucine</p> <p>Lys : Lysine</p> <p>M : unité mannuronique de l'alginate</p> <p>MATS : Microbial Adhesion To Solvents</p> <p>MC : méthylcellulose</p> <p>MEB : Microscopie Électronique à Balayage</p> <p>Met : Méthionine</p> <p>MRS : milieu De Man Rogosa et Sharp</p> <p>MRS_b : Bouillon De Man Rogosa et Sharp</p> <p>MRS_g : Gélose De Man Rogosa et Sharp</p> <p>MRS_m : Bouillon De Man Rogosa et Sharp modifié</p> <p>M17_b : Bouillon M17</p>	<p>M17_g : Gélose M17</p> <p>NaCl : chlorure de sodium</p> <p>NSI : « Nitrogen Solubility Index »</p> <p>O₂ : dioxygène</p> <p>O₂⁻ : groupement superoxyde</p> <p>OH⁻ : groupement hydroxyle</p> <p>PBS : « Phosphate Buffer Saline » (tampon phosphate salin)</p> <p>Phe : Phénylalanine</p> <p>PVDF : « PolyVinylidene Fluoride » (polyfluorure de vinylidène)</p> <p>QS : « Quorum Sensing »</p> <p>RITC : Rhodamine B Isothiocyanate</p> <p>RMN : Résonance Magnétique Nucléaire</p> <p>RTA : Réponse de Tolérance à l'Acide</p> <p>RTE : « Ready To Eat » (prêts à consommer)</p> <p>S : Surnageant</p> <p>SDS : « Sodium Dodecyl Sulfate » (dodécylsulfate de sodium)</p> <p>SM : Spectrométrie de Masse</p> <p>SN : Surnageant Neutralisé</p> <p>T : Température</p> <p>Tryp : Tryptophane</p> <p>TS : Tryptone sel</p> <p>TSA : Tryptone Soja Agar</p> <p>TSB : Bouillon Tryptone Soja</p> <p>Tyr : Tyrosine</p> <p>UFC : Unité Formant Colonie</p> <p>UI : Unité Internationale</p> <p>VNC : viable non cultivable</p> <p>Zi : Zone d'Inhibition</p>
--	---

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Composition des milieux de culture.....	261
Annexe 2. Principe du dosage de l'acide lactique_Kit Megazyme D-lactic acid and L-lactic acid (K-DLATE).....	267
Annexe 3. Électrophorèse Tricine-Page_Protocole détaillé.....	269
Annexe 4. Publication 1 dans Colloids and Surfaces B: Biointerfaces « <i>Preferential localization of Lactococcus lactis cells entrapped in a caseinate/alginate phase separated system</i> ».....	271
Annexe 5. Publication 2 dans Food Control « <i>Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control Listeria monocytogenes growth: comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping Lactococcus lactis subsp. lactis cells</i> »	278
Annexe 6. « <i>Intensification of Lactococcus lactis subsp. lactis antimicrobial activity by modulating the culture medium composition and the incubation temperature</i> » International conference: Food Science, Engineering and technologies 2012. University of Food Technologies (UFT). Plovdiv, Bulgarie (19-20 octobre 2012). Résumé publié dans Scientific Works of UFT, Volume LIX-2012, section Biotechnology, Nanotechnology, Ecology, pp. 609-615.....	288

LISTE DES VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

- Léonard L., Gharsallaoui A., Oualli F., Degraeve P., Waché Y., Saurel R., Oulahal N. (2013) ***Preferential localization of Lactococcus lactis cells entrapped in a caseinate/alginate phase separated system***, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109: 266-272.
- Léonard L., Degraeve P., Gharsallaoui A., Saurel R., Oulahal N. (2013) ***Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control Listeria monocytogenes growth: comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping Lactococcus lactis subsp. lactis cells***, *Food Control*, 37: 200-209.

Communications orales

- Léonard L., Gharsallaoui A., Degraeve P., Saurel R., Oulahal N. ***Design of biopolymeric gels entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control Listeria monocytogenes growth***. Biopolymers 2013. Nantes, France (4-6 décembre 2013).
- Léonard L., Beji O., Saurel R., Degraeve P., Gharsallaoui A., Oulahal N. ***Inclusion de bactéries lactiques dans des matrices d'alginate ou d'alginate-caséinate pour une activité anti-Listeria en vue de la bioprotection de la surface de fromage***. RMT FlorePro. Paris, France (27 juin 2013).
- Léonard L., Saurel R., Degraeve P., Gharsallaoui A., Oulahal N. ***Protection de surface par des bactéries lactiques incluses dans des matrices d'alginate ou d'alginate-caséinate pour une activité anti-Listeria***. Symposium Franco-Marocain 2013_Bioadhésion-Biofilms : Des méthodes d'analyse aux nouvelles stratégies de maîtrises. Fès, Maroc (28 mai 2013).
- Léonard L., Gencheva P., Degraeve P., Saurel R., Oulahal N. ***Intensification of Lactococcus lactis subsp. lactis antimicrobial activity by modulating the culture medium composition and the incubation temperature***. International conference: Food Science, Engineering and technologies 2012. University of Food Technologies (UFT). Plovdiv, Bulgarie (19-20 octobre 2012).
Résumé publié dans Scientific Works of UFT, Volume LIX-2012, section Biotechnology, Nanotechnology, Ecology, pp. 609-615.
- Léonard L., Saurel R., Degraeve P., Gharsallaoui A., Oulahal N. ***Lactococcus lactis subsp. lactis inclu dans une matrice alginate-caséinate pour une activité anti-Listeria***. JTJ Interbio 2012. Paris, France (20 juin 2012).
Résumé publié dans la revue Industries Alimentaires et Agricoles (IAA), Septembre-octobre 2012, n°08/09 2012, pp. 37.

Affiches

- Léonard L., Gharsallaoui A., Chouchène I., Oualli F., Degraeve P., Saurel R., Oulahal N. ***Anti-Listeria activity of calcium alginate and calcium alginate caseinate matrices entrapping Lactococcus lactis***. MATBIM 2012 - 2nd international meeting on material/bioproduction Interaction. Dijon, France (22-25 avril 2012).

- Léonard L., Dumas E., Jamet E., Degraeve P., Saurel R., Gharsallaoui A., Oulahal N. ***Selection of Lactic Acid Bacteria (LAB) strains for bioprotective application with LAB entrapment in polymeric matrices (First step: Selection of LAB cultures to inhibit Listeria monocytogenes in liquid medium)***. Forum des Jeunes Chercheurs 2011 – Ecole doctorale E2S de l'Université de Bourgogne. Dijon, France (16-17 juin 2011).
Lauréate d'un prix dans la section « Meilleures Communications affichées »
- Léonard L., Oulahal N., Dumas E., Gharsallaoui A., Degraeve P., Saurel R. ***Development of bioprotective biphasic matrices (alginate/sodium caseinate) with lactic acid bacteria***. 1st International CIGR Workshop on Food Safety: Advances and trends. Dijon, France (14-15 avril 2011).

Introduction

De la matière première au consommateur, les aliments peuvent être contaminés par des microorganismes pathogènes et/ou d'altération. Ces derniers peuvent provoquer des modifications au niveau des propriétés organoleptiques comme la couleur, le goût, l'odeur, la texture. Les microorganismes pathogènes, quant à eux, sont responsables d'infections et d'intoxications alimentaires dont les symptômes varient en fonction du microorganisme : vomissements, diarrhées, fièvre, fatigue physique, ... Dans la majorité des cas, les symptômes sont de courte durée et sans gravité. Cependant, la consommation d'aliments contaminés par des microorganismes pathogènes peut entraîner des problèmes de santé plus importants pouvant aller jusqu'au décès. Par exemple, pour cette catégorie de maladie, la deuxième cause de mortalité juste après la salmonellose en France est la listériose, dont *Listeria monocytogenes* est l'agent étiologique bactérien (Goulet *et al.*, 2008). Le contrôle de *L. monocytogenes* reste un challenge du fait de ses capacités à survivre et à persister dans des environnements hostiles. Cela explique la difficulté à prévenir la présence de cette souche dans des aliments non ou peu transformés (Neunlist *et al.*, 2005 ; Lehrke *et al.*, 2011) et dans les aliments prêts à consommer. Ces deux catégories d'aliments étant de plus en plus consommés, la maîtrise du risque que représente *L. monocytogenes* appelle donc une vigilance particulière. En effet, en 2012, Sant'Ana *et al.* ont observé que *L. monocytogenes* était capable de se développer à des taux élevés dans plusieurs types de légumes prêts à consommer qui auraient été conservés partiellement ou totalement à des températures non appropriées. La même année, Lambertz *et al.* ont étudié plusieurs catégories d'aliments prêts à consommer et ont détecté *L. monocytogenes* dans 0,4 % des 525 échantillons de fromages analysés, 1,2 % des 507 échantillons de produits carnés analysés et 12 % des 558 échantillons de poissons analysés.

Afin de minimiser le risque sanitaire tout en préservant les qualités organoleptiques des denrées alimentaires, plusieurs moyens de conservation ont été développés. Les caractéristiques de l'aliment (facteurs intrinsèques : éléments nutritifs, pH, activité de l'eau (a_w), présence de molécules antimicrobiennes) et son environnement (facteurs extrinsèques : température (T), humidité relative, constituants de l'atmosphère dans laquelle l'aliment est conservé (teneurs respectives en O₂ et CO₂ notamment)) influencent la croissance de ces microorganismes. Les techniques de conservation utilisées en industrie agroalimentaire sont très variées et se basent sur leur destruction thermique plus ou moins poussée (pasteurisation, stérilisation, appertisation) et/ou sur la création d'un environnement hostile au développement des microorganismes d'altération et des pathogènes. Ce dernier est le plus souvent obtenu par le froid (réfrigération, congélation) permettant d'augmenter la

durée de vie des aliments en ralentissant ou bloquant le développement des microorganismes. Une autre stratégie consiste à obtenir une activité de l'eau suffisamment basse pour empêcher la croissance des microorganismes en éliminant l'eau en totalité ou de façon partielle (séchage, lyophilisation) et/ou en ajoutant des agents dépresseurs de l'activité de l'eau (salage). En complément des procédés physiques, des molécules chimiques ayant une activité antimicrobienne (comme les conservateurs (E200 (acide sorbique) à E297 (acide fumarique)) appartenant à la liste positive des additifs alimentaires autorisés) peuvent être ajoutés aux aliments. Un dernier moyen couramment employé pour préserver les qualités sanitaires des denrées alimentaires est l'utilisation des emballages sous vide ou sous atmosphère modifiée.

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. Les métabolites produits par les bactéries lactiques (LAB pour « Lactic Acid Bacteria ») répondent à ces critères. Parmi différentes méthodes de conservation des aliments en cours de développement, les LAB bioprotectrices s'avèrent donc être des outils prometteurs pour la biopréservation des aliments. Leurs métabolites notamment les bactériocines, sont d'ailleurs déjà utilisés dans cette optique. Néanmoins, seule une bactériocine, la nisine, est actuellement autorisée comme additif alimentaire (E234). Cependant, l'activité antimicrobienne des cellules entières de LAB est due à plusieurs mécanismes pouvant agir en synergie : compétition pour l'espace et les nutriments, diminution du pH (par la production d'acides organiques), production de peroxydes, de gaz (CO₂), de diacétyl et de bactériocines (Galvez *et al.*, 2007). De ce fait, plusieurs études ont montré que les cellules de LAB pouvaient réduire la croissance de *L. monocytogenes* dans la viande et les produits de la mer (Lücke, 2000 ; Budde *et al.*, 2003 ; Jacobsen *et al.*, 2003 ; Tahiri *et al.*, 2009) et, également inhiber d'autres bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteridis et *Staphylococcus aureus*) (Trias *et al.*, 2008). Un bon exemple applicatif est la pulvérisation d'un ferment lactique sur des crevettes cuites (commercialisées par la société Miti (44, France)) aboutissant à une durée de

vie du produit au moins aussi longue qu'en utilisant des conservateurs chimiques (Matamoros *et al.*, 2009).

Dans une première approche, de nombreux chercheurs ont observé la réduction de la population de microorganismes pathogènes dans des aliments ou des systèmes modèles enveloppés dans des emballages contenant des métabolites antimicrobiens produits par les LAB et notamment les bactériocines (Scannell *et al.*, 2000a ; Millette *et al.*, 2007 ; Neetoo *et al.*, 2008 ; Cao-Hoang *et al.*, 2010 ; Ercolini *et al.*, 2010 ; Iseppi *et al.*, 2011 ; Da Silva Malheiros *et al.*, 2012).

Plus récemment, des cellules entières de LAB ont été immobilisées dans des films ou des gels pour cette même application de biopréservation (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2013). Des cellules de LAB bioprotectrices ont déjà été immobilisées dans des matrices de caséinate (Gialamas *et al.*, 2010), d'alginate et d'amidon (Concha-Meyer *et al.*, 2011) ou d'alcool polyvinylique (PVOH) (Iseppi *et al.*, 2011) pour cibler une activité anti-*Listeria*. Le développement de matrice incluant des cellules entières productrices d'agents antimicrobiens pourrait être une alternative réglementaire acceptable puisque la majeure partie des LAB sont considérées comme « GRAS » (« Generally Recognized As Safe ») par la « Food and Drug Administration » (Trias *et al.*, 2008).

Ces méthodes d'immobilisation s'appuient sur les développements dans le domaine des probiotiques et des biotechnologies (Mandal *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2008 ; Sonomoto *et al.*, 2000). Les matrices antimicrobiennes contenant des cellules entières de LAB bioprotectrices peuvent être considérées comme une alternative prometteuse aux conservateurs chimiques pour au moins deux raisons :

- (i) d'un point de vue économique, l'incorporation de cellules entières est moins coûteuse que l'incorporation des métabolites qu'elles produisent (qu'il est alors nécessaire d'extraire et de purifier au préalable) ;
- (ii) en plus de leur efficacité pendant le temps de réfrigération, la croissance des cellules bioprotectrices et leur production de métabolites antimicrobiens sont activées lorsque la température augmente, phénomène se produisant lors d'un accident de stockage.

L'incorporation de microorganismes bioprotecteurs dans des matrices de composition et de structure choisies pourrait donc être une stratégie innovante pour leur procurer un micro-environnement favorisant la préservation de leur viabilité et de leur capacité antimicrobienne.

De plus, il y a un intérêt grandissant pour le développement de systèmes d'encapsulation, de

protection et de libération de substances actives, à bases de biopolymères (Matalanis *et al.*, 2011). Des mélanges de protéines et de polyosides ont été proposés pour formuler de tels systèmes. Plusieurs structures peuvent être observées du fait des interactions entre protéines et polyosides. L'exemple le plus répandu de ce type d'interaction est l'attraction électrostatique entre deux polymères ayant des charges opposées conduisant à la formation de complexes moléculaires. Cependant, lorsque les interactions biopolymère-solvant sont favorisées et dans des domaines où les concentrations en biopolymères sont élevées, chaque phase contient préférentiellement un biopolymère ; il s'agit d'une séparation de phase ségrégative gouvernée par l'incompatibilité thermodynamique (Grinberg et Tolstoguzov, 1997 ; Capron *et al.*, 2001 ; Mc Clements, 2006). Ce type de mélange en séparation de phase peut engendrer une grande variété de microstructures (Mc Clements, 2006) qui pourrait être intéressante dans le cas de l'immobilisation de cellules bioprotectrices.

C'est en partant de ce constat que le laboratoire BioDyMIA (Equipe Mixte d'Accueil Université Lyon 1-Isara Lyon) et l'équipe Procédés Alimentaires et Physico-Chimie (PAPC) (Unité Mixte de Recherche Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Agrosup Dijon, Université de Bourgogne) ont développé le projet « Microorganismes en milieu confiné : application aux emballages bioprotecteurs » dans le cadre duquel se sont inscrits mes travaux de thèse. L'objectif de cette étude a été de passer de l'utilisation directe de la molécule d'intérêt à celle d'une bactérie productrice de cette molécule ou d'un ensemble de métabolites pouvant agir en synergie pour lutter contre une contamination de souches de *Listeria* spp. Le volet microbiologique (sélection de souches de bactéries lactiques bioprotectrices, suivi de la viabilité et de l'activité antimicrobienne) a été mis en œuvre au sein de BioDyMIA et le volet physico-chimique (choix de la matrice d'immobilisation, étude des microstructures) a été réalisé au sein de l'équipe PAPC.

Le travail présenté dans ce manuscrit concerne l'étude de systèmes bioprotecteurs immobilisant des souches de bactéries lactiques dans des matrices polymériques (protéine/polyoside). D'un point de vue fondamental, il s'agissait de comprendre comment la structure du système polymérique et le confinement des LAB pouvaient influencer sur leur viabilité et leur activité antimicrobienne.

Ce document s'articule en trois parties :

- La première partie est une étude bibliographique qui présente les principales données de la littérature sur les bactéries lactiques bioprotectrices, les systèmes d'immobilisation de

cellules bactériennes et la physico-chimie des systèmes polymériques biphasiques, permettant de comprendre le choix de notre système d'étude ;

- L'ensemble des méthodes et protocoles mis en œuvre pendant cette thèse est décrit dans une deuxième partie (matériels et méthodes) ;
- La troisième partie est consacrée aux résultats et se découpe en trois volets :
 - un premier volet concernant la sélection des souches de LAB d'intérêt et la caractérisation des métabolites antimicrobiens des principales souches sélectionnées ;
 - un second volet relatif à la formulation et à la caractérisation des matrices d'immobilisation choisies ;
 - un dernier volet sur l'évaluation de l'activité anti-*Listeria* des matrices polymériques, supports des actifs antimicrobiens produits *ex situ* et *in situ*.

CHAPITRE 1 : Étude bibliographique

*La conservation des aliments reste un challenge pour tous les pays, qu'ils soient développés ou non. En effet, les cas d'infection par des aliments contaminés par des pathogènes sont en recrudescence notamment dans les pays développés comme en Europe ou aux États-Unis (Goulet et al., 2008). Parmi ces risques bactériens, la listériose, dont *Listeria monocytogenes* est l'agent étiologique, est la deuxième cause de mortalité juste après la salmonellose en France pour cette catégorie de maladie. Pour renforcer la sécurité microbiologique des aliments et avec l'émergence de procédés non-thermiques pour la conservation et l'extension de la durée de vie des aliments (demandés par les consommateurs), l'emballage devient une partie primordiale. La nouvelle génération d'emballage pourra inclure des matériaux ayant des propriétés antimicrobiennes. De nombreuses voies sont en ce moment développées : l'addition de sachets contenant des agents antimicrobiens volatils, l'incorporation des agents directement dans le polymère, le revêtement du polymère d'une couche d'actifs, l'utilisation d'un polymère possédant déjà des propriétés antimicrobiennes. L'utilisation des bactéries lactiques (LAB) est une autre possibilité pour développer des matrices contenant non pas directement les agents antimicrobiens mais la source de production de ces agents, les LAB bioprotectrices.*

*Ce chapitre sera consacré à une revue bibliographique regroupant les différents aspects de ce travail. Une première partie sera focalisée sur les LAB bioprotectrices avec la présentation des différents mécanismes antimicrobiens dont elles sont pourvues. Une synthèse de l'utilisation actuelle des LAB pour la conservation des aliments sera exposée. Enfin, le risque *Listeria* dans le domaine agroalimentaire sera abordée ainsi que les méthodes pour mettre en évidence les propriétés antimicrobiennes des LAB.*

Dans un seconde étape, les systèmes d'immobilisation des LAB seront présentés. Cette partie intégrera également des données concernant les mécanismes physico-chimiques mis en jeu par les LAB lors d'un confinement et les méthodes permettant de les localiser dans de tels systèmes.

Enfin, une dernière partie développera les principes du système d'immobilisation choisi pour ce travail de thèse : les systèmes polymériques biphasiques et plus particulièrement les mélanges alginate de sodium / caséinate de sodium.

1.1 Les bactéries lactiques (LAB) bioprotectrices

1.1.1 Les LAB

1.1.1.1 Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques regroupent plusieurs genres dont le caractère commun est la production de l'acide lactique suite à la fermentation de glucides (Labioui *et al.*, 2005). Elles sont non pathogènes et comptées, pour la majorité, parmi les microorganismes « GRAS » (« Generally Recognized As Safe ») par la « Food and Drug Administration » (FDA) (Trias *et al.*, 2008). Néanmoins, certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins, 1993).

Les LAB sont des bacilles ou des coques à Gram positif, immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts et catalase négatif (Settanni et Moschetti, 2010). Elles sont mésophiles mais elles sont capables de croître dans un intervalle de températures allant de 5°C à 45°C. Le pH optimal de croissance varie de 5,0 à 9,0 mais elles tolèrent les milieux acides (pH 3,2) et alcalins (pH 9,6) (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Van de Guchte *et al.*, 2002). Les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que la vitamine B, des acides aminés, des bases azotées, des peptides (Trias, 2008). Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs car les milieux de croissance ont besoin d'être « riches ». L'abaissement du pH sera généralement utilisé comme moyen de sélection.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires qui sont fréquemment retrouvés dans certains aliments tels que le lait et ses dérivés, la viande, les fruits et les légumes. Elles représentent aussi une partie de la microflore intestinale et génitale humaine et animale (Trias, 2008 ; Leroi, 2010).

1.1.1.2 Classification

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen en 1919. Actuellement et suite à plusieurs révisions taxonomiques, ce groupe compte plusieurs genres qui appartiennent tous au phylum Firmicutes, à la classe *Bacilli* et à l'ordre des Lactobacillales. Par contre, il est représenté par différentes familles (Brenner *et al.*, 2005) (**Tableau 1.1**).

Tableau 1.1 Familles et principaux genres des bactéries lactiques (Brenner *et al.*, 2005).

Familles	Principaux genres
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Oenococcus sp.</i> , <i>Weissella sp.</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium sp.</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Tetragenococcus sp.</i> , <i>Vagococcus sp.</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus sp.</i>

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont parfois considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de leurs propriétés physiologiques et biochimiques et à leur présence dans le même habitat écologique. Cependant, ces microorganismes appartiennent au phylum *Actinobacteria* et sont donc phylogénétiquement éloignées des bactéries lactiques (Trias, 2008). Les bactéries lactiques forment donc un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect, leur habitat, ...

1.1.1.3 Métabolisme

1.1.1.3.1 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 1.1** (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 diacétyle, l'acétaldéhyde) (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Trias, 2008) (**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2 Type de fermentation et produits majoritaires en fonction du genre de LAB (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(+)

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 1.1**).

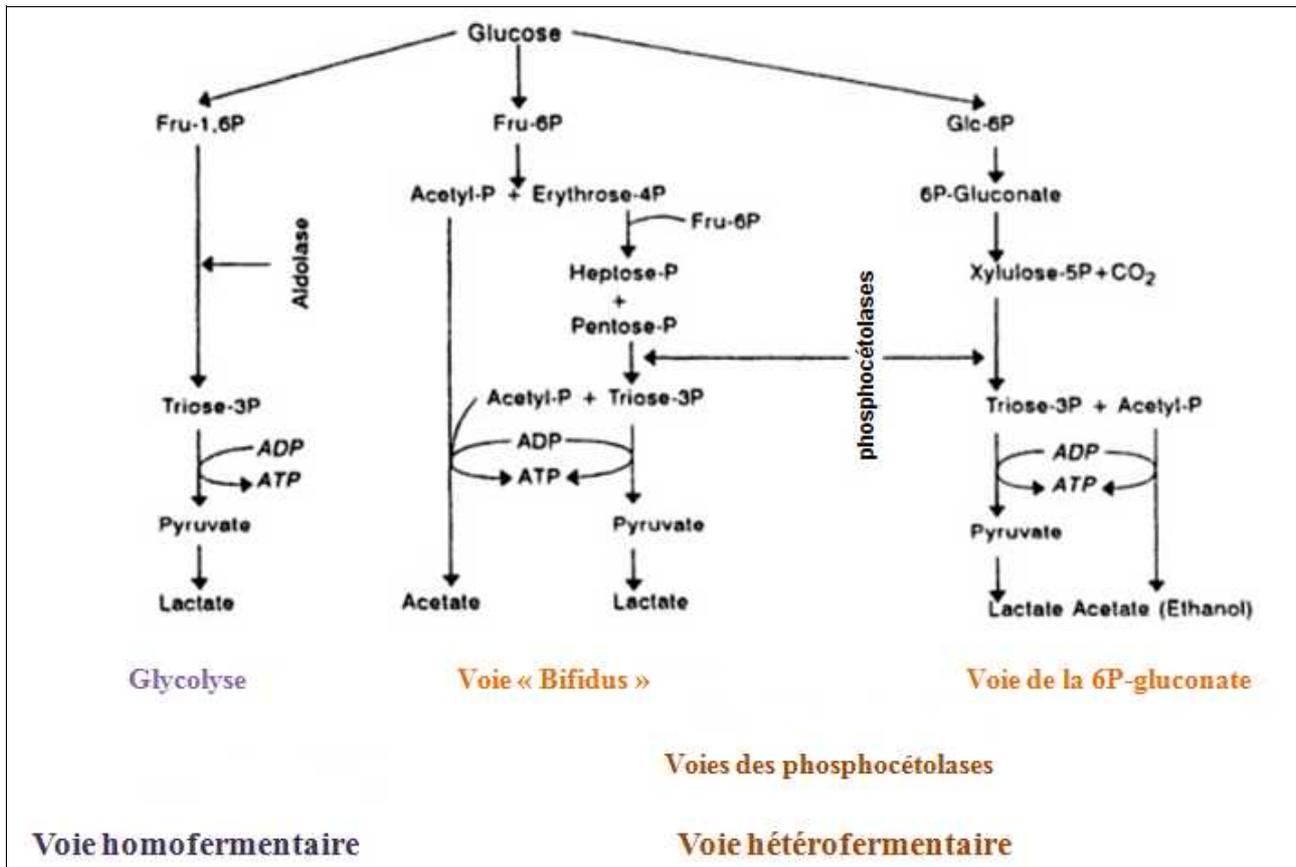


Figure 1.1 Représentation schématique des deux voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (d'après Kandler, 1983).

ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate

1.1.1.3.2 Métabolisme de l'azote

Hugenholtz et Kleerebezem ont publié en 1999 une revue concernant les données disponibles sur le métabolisme des LAB et notamment le métabolisme de l'azote. Les LAB 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 LAB 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 LAB 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 LAB 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 LAB dans le lait (**Figure 1.2**). 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.

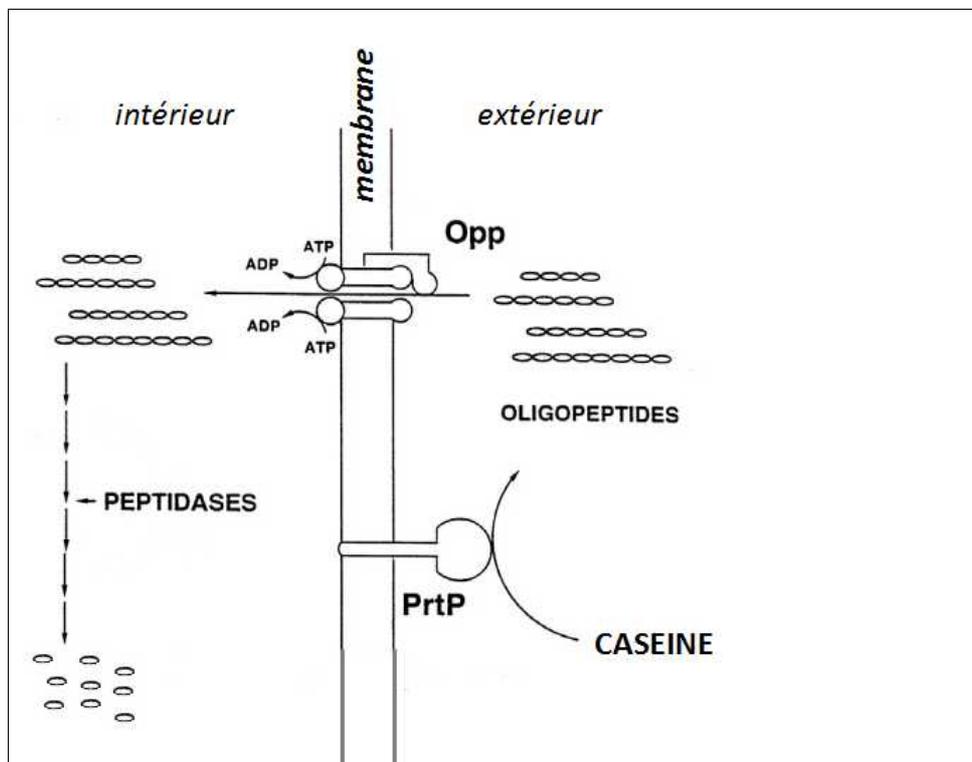


Figure 1.2 Modèle du système protéolytique chez *Lactococcus lactis* (d'après Salminen et Von Wright, 2009).

Opp : transporteur d'oligopeptide ; PrtP : protéase membranaire

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 LAB 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).

1.1.2 Mécanismes antimicrobiens des LAB bioprotectrices

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 1.3**).

Tableau 1.3 Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire sécrétés 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</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>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
Reutérine	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Champignons, Protozoaires Bactéries à Gram +/-

1.1.2.1 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 LAB et *Listeria* spp. (Nilsson *et al.*, 1999 ; Buchanan et Bagi, 1997) et, pour les LAB 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 LAB 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 LAB inhibitrices, un large spectre de molécules est produit : acides organiques (principalement l'acide lactique), reutéline, peroxyde d'hydrogène, dioxyde de carbone, diacétyle (le 2,3-butanedione) et bactériocines.

1.1.2.2 La production de métabolites antimicrobiens non peptidiques

1.1.2.2.1 Les acides organiques, effet pH

Les bactéries lactiques produisent des acides organiques par fermentation des glucides (Makhloufi, 2011). 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (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 LAB 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 LAB 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) :

- (i) pendant la phase logarithmique de croissance, les mécanismes commencent à être induit

par l'exposition à un pH acide non létal ;

- (ii) 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).

1.1.2.2.2 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est produit par les bactéries lactiques en présence d'oxygène. En 2011, Enitan *et al.* ont testé 63 souches de LAB pour leurs production de peroxyde d'hydrogène parmi lesquelles *Lactobacillus fermentum*, *brevis*, *casei*, *bulgarus*, *plantarum* ; *Leuconostoc mesenteroides* ; *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophiles*. Tous les isolats ont été producteurs et le meilleur rendement dans le milieu MRS a été atteint par *Lactococcus lactis* avec une production de 0,4279 mg/L⁻¹.

Le peroxyde d'hydrogène présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde (O₂[•]) et le groupement hydroxyle (OH[•]) capables d'endommager l'ADN bactérien. En outre, le pouvoir inhibiteur du peroxyde d'oxygène pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydriles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes. De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (Ammor *et al.*, 2006 ; Dalié *et al.*, 2010). Romanova *et al.*, 2002, ont mesuré

les concentrations minimales inhibitrices de H₂O₂ sur 19 souches de *Listeria monocytogenes*. Les cultures des plus sensibles sont inhibées dès 9,4 µg.mL⁻¹ de H₂O₂ dans le milieu de culture alors que d'autres sont capables de résister jusqu'à des valeurs de 75 µg.mL⁻¹.

La culture en condition d'anaérobiose minimiserait voire inhiberait la production de peroxydes (Martinis *et al.*, 2001 ; Çon *et al.*, 2001).

1.1.2.2.3 Le dioxyde de carbone

Le CO₂ est principalement formé pendant la fermentation des hexoses suivant la voie hétérofermentaire. Le pouvoir antimicrobien du dioxyde de carbone produit par les bactéries lactiques s'explique par la création d'une atmosphère anaérobie qui inhibe la croissance de certains microorganismes aérobies tels que la flore d'altération psychrophiles à Gram négatif. De plus, l'accumulation du dioxyde de carbone dans la membrane lipidique de la cellule cible pourrait modifier sa perméabilité (Ammor *et al.*, 2006 ; Salminen et Von Wright, 2009).

1.1.2.2.4 Le diacétyle

Le diacétyle (C₄H₆O₂) est un composé aromatique produit par les LAB par fermentation du citrate. Cette molécule est caractérisée par une large activité antimicrobienne à des concentrations allant de 200 à 1 000 µg.mL⁻¹ (Lanciotti *et al.*, 2003). La production de diacétyle par les différentes souches de LAB dépend du milieu, du pH et de la température d'incubation. Christensen et Pederson en 1958, ont montré que les espèces homofermentaires produisaient le diacétyle plus rapidement et dans des quantités plus importantes que les espèces hétérofermentaires. Dans un milieu classique, ils ont obtenu une production maximale de 12 µg.mL⁻¹ pour la souche *Lactobacillus bulgaricus* 7994.

Le mécanisme d'action du diacétyle n'est pas encore connu précisément, néanmoins il est possible qu'il interagisse avec les résidus arginine des enzymes fonctionnelles (Olasupo *et al.*, 2003). Les souches de *Listeria* sont inhibées à partir d'une concentration de 344 µg.mL⁻¹ (Ammor *et al.*, 2006). Lanciotti *et al.*, en 2003, ont additionné au milieu de culture liquide 300 ppm de diacétyle. La phase de latence a été augmentée de 4,23 ; 2,48 et de 1,52 fois respectivement pour les souches de *Escherichia Coli* X1, *Staphylococcus aureus* F et *Listeria monocytogenes* Scott A, confirmant que les bactéries à Gram négatif (et les levures) sont plus sensibles que les bactéries à Gram positif (Ammor *et al.*, 2006). Olasupo *et al.*, en 2003 également, ont rapporté une concentration minimale inhibitrice de 7,5 et de 12,5 mmol.L⁻¹ pour respectivement une souche d'*Escherichia Coli* et de

Salmonella Typhimurium LT2.

1.1.2.2.5 La reutérine

La reutérine est un produit de fermentation du glycérol. Elle est produite par quelques souches de LAB telles que *Lactobacillus reuteri* (Chung *et al.*, 1989), *Lactobacillus brevis* (Schütz et Radler, 1984), *Lactobacillus buchneri* (Schütz et Radler, 1984), *Lactobacillus collinoides* (Claisse et Lonvaud-Funel, 2000) et *Lactobacillus coryniformis* (Magnusson, 2003). Cette molécule inhibe la croissance de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que des mycètes et des virus (Chung *et al.*, 1989). Cette activité pourrait être due à une inhibition de l'activité de la ribonucléotide réductase, entraînant une inhibition de la synthèse de l'ADN des cellules cibles (Dobrogosz *et al.*, 1989).

1.1.3 Les bactériocines

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique, modifiées ou non post-traductionnellement et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles sont douées d'une activité antimicrobienne envers des espèces microbiennes phylogénétiquement proches de l'espèce productrice (Ammor *et al.*, 2005 ; Castellano *et al.*, 2008 ; Dalié *et al.*, 2010). Leur spectre d'activité varie d'une bactériocine à une autre mais avec une activité dirigée principalement contre les bactéries à Gram positif (Dortu et Thonart, 2009). Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux bactériocines car elles sont protégées par leur membrane externe qui empêche les bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009). D'une manière générale, les bactériocines sont thermostables, solubles et actives à pH acide (Laboui *et al.*, 2005), non toxiques pour les cellules eucaryotes et sensibles aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal (Wijaya *et al.*, 2006), ce qui permet d'éviter les interférences avec la microflore intestinale (Castellano *et al.*, 2008). De plus, d'un point de vue physico-chimique, elles sont généralement cationiques, amphiphiles, non structurées en solution aqueuse (Reis *et al.*, 2012).

La bactériocine la plus connue est la nisine produite par *Lactococcus lactis*. C'est la seule bactériocine, commercialisée sous le nom de Nisaplin™ (DANISCO, Copenhague, Danemark) depuis 1953 (Deegan *et al.*, 2006), autorisée comme additif alimentaire aux États-Unis depuis 1968 et en Europe (E234) depuis 1995 (Gillor *et al.*, 2008). La directive européenne 95/2/EC fixe les

quantités à (European Food Safety Agency, 2006) :

- 12,5 mg.kg⁻¹ pour les fromages affinés et fondus ;
- 10 mg.kg⁻¹ pour le mascarpone et la crème fraîche épaisse ;
- 3 mg.kg⁻¹ pour les poudings.

La Pédicocine PA-1 produite par *Pediococcus acidilactici* est aussi commercialisée sous le nom d'ALTA™ 2431 (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Irlande) mais elle n'est pas encore approuvée comme additif alimentaire. 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 1.4**). Le laboratoire « Functional Proteomics & Alimentary Bio-preservation Research Unit » (« Institute of Applied Biological Sciences Tunis (ISSBAT) ») en collaboration avec l'institut « Nutraceuticals and Functionnal Foods » (Université Laval, Canada) ont mis en ligne une base de données « Bactibase Database » regroupant les connaissances les plus récentes concernant les bactériocines.

Tableau 1.4 Quelques bactériocines produites par les LAB (Charlier *et al.*, 2009 ; Reis *et 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 Lactocine 481 Enterocin A Lactocine 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 tyrobutyricum</i> <i>L. monocytogenes</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. gelidum</i> <i>L. mesenteroïdes</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.

1.1.3.1 Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont classées en quatre classes qui se distinguent les unes des autres par leur structure chimique, par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques (dont la stabilité thermique) et leur spectre et mode d'action (Dortu et Thonart, 2009) (**Tableau 1.5**).

Tableau 1.5 Classification des bactériocines (d'après Reis *et al.*, 2012).

Classes	Caractéristiques principales	Stabilité thermique	Exemples
Classe I Lantibiotiques	-cycles thioesther 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 Lactocine 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

1.1.3.1.1 Classe I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des petits peptides (de taille inférieure à 5 kDa) thermostables. Ils contiennent des acides aminés inhabituels car modifiés tels que la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyryne et la déhydroalanine (Deegan *et al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009). Cette classe de bactériocines est subdivisée en deux sous-classes basées sur la localisation des ponts établis entre les acides aminés modifiés. Ainsi, on distingue la classe Ia (type A) qui comprend les peptides cationiques linéaires (ex. la nisine) et la classe Ib (type B) qui contient les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette (ex. la Mersacidine). Il existe également des lantibiotiques composés de deux peptides qui agissent ensemble (ex. la Lactocine 3147) (Gillor *et al.*, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009). La **Figure 1.3** illustre un exemple de chaque type de lantibiotique.

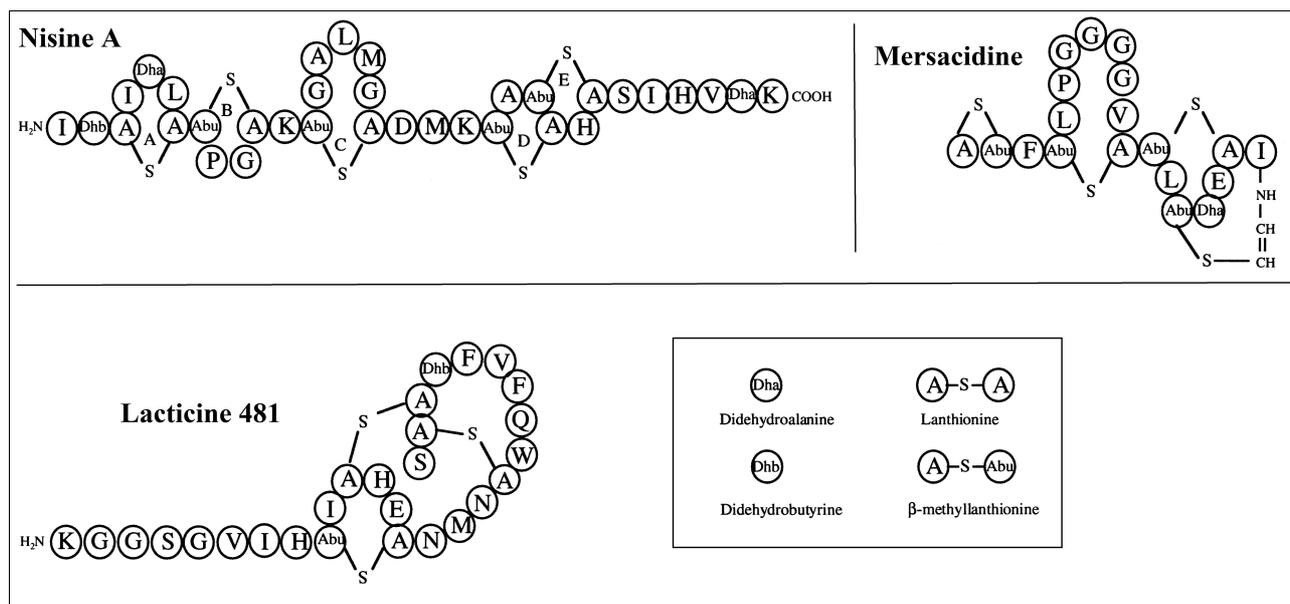


Figure 1.3 Séquence protéique et structure d'un lantibiotique de type A (la nisine), B (la Mersacidine), de la lacticine 481 (McAuliffe *et al.*, 2001).

1.1.3.1.2 Classe II : les non-lantibiotiques

Les bactériocines appartenant à cette classe sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa et thermostables. Elles ne contiennent pas d'acides aminés modifiés. Cette classe se divise en trois sous-classes.

La sous-classe IIa comprend des bactériocines formées de 27 à 48 acides aminés qui possèdent un pont disulfure ainsi qu'une partie N-terminale hydrophobe contenant une séquence consensus. La région C-terminale hydrophobe ou amphiphile, moins conservée, détermine la spécificité d'action (Dortu et Thonart, 2009). Cette sous-classe est représentée par la Pédiocine, la Sakacine A et la Leucocine A qui ont toutes une activité contre le pathogène *Listeria monocytogenes* (Gillor *et al.*, 2008). Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent un autre pont disulfure dans la région C-terminale. Celui-ci permettrait la stabilisation de la structure tertiaire, une meilleure activité antimicrobienne, ainsi qu'un spectre d'action plus large (Eijsink *et al.*, 1998).

La sous-classe IIb comprend des bactériocines à deux peptides. Ces deux peptides peuvent être actifs individuellement mais ils agissent de façon synergique quand ils sont associés. Ils peuvent également être inactifs individuellement et leur activité est subordonnée à l'association des deux peptides. Cette sous-classe est représentée par la Lacticine F et la Lactococcine G (Cotter *et al.*, 2005 ; Dortu et Thonart, 2009). Les bactériocines de cette sous-classe inhibent une large gamme de bactéries à Gram positif (Dortu et Thonart, 2009).

La sous-classe IIc regroupe les bactériocines ne répondant pas aux critères des autres classes. Il s'agit, par exemple, de l'Acidocine 1B (Gillor *et al.*, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009).

1.1.3.1.3 Classe III : les protéines à hauts poids moléculaires

Ces bactériocines sont de tailles supérieures à 30 kDa et thermolabiles. Elles se distinguent des autres classes par leur structure et leur mode d'action. Seulement quatre bactériocines appartenant à cette classe ont été caractérisées au niveau génétique : l'Helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'Entérolysine A produite par *Enterococcus faecium*, la Zoocine A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la Millericine B produite par *Streptococcus milleri* (Dortu et Thonart, 2009).

1.1.3.1.4 Classe IV : les bactériocines complexes

Cette classe comprend des bactériocines hétérogènes. Elles renferment une partie non protéique, généralement un glucide ou un lipide, indispensable à l'activité biologique (Dortu et Thonart, 2009). La Plantaricine S, la Leuconocine S et la Lactocine 27 font partie de cette classe (Gillor *et al.*, 2008).

1.1.3.2 Mode d'action des bactériocines

Les bactéries lactiques agissent généralement au niveau de la membrane plasmique des cellules cibles. Pour cette raison, les bactériocines ont un effet sur les bactéries à Gram négatif très limité car la membrane externe de ces dernières empêche la pénétration des bactériocines vers la membrane interne (Dortu et Thonart, 2009).

Le mode d'action général des lantibiotiques comporte deux étapes (**Figure 1.4**). Dans un premier temps, ils vont interagir avec la membrane cytoplasmique du microorganisme cible par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques, les lipides II (composants de la membrane plasmique et précurseurs des peptidoglycanes) (Deegan *et al.*, 2006). Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique. La formation des pores cause le passage rapide de certains composés cytoplasmiques (les ions, les acides aminés, ...) du cytoplasme vers le milieu extérieur de la cellule (Dortu et Thonart, 2009) engendrant l'arrêt des activités cellulaires et la mort de la cellule (Gillor *et al.*, 2008).

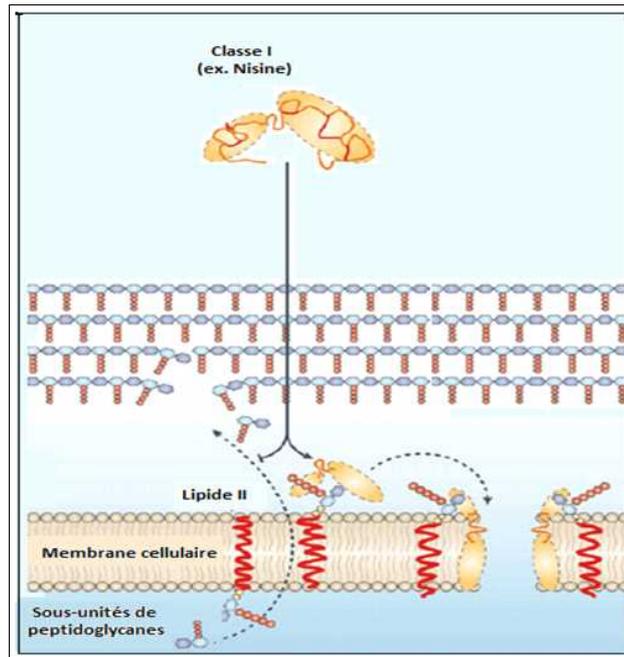


Figure 1.4 Mode d'action d'un exemple de lantibiotique, la nisine (Cotter *et al.*, 2005).

Les bactériocines non-lantibiotiques interagissent avec la membrane de la cellule cible (**Figure 1.5**) ou au niveau d'un récepteur bien spécifique, la mannose perméase (système « mannose-phosphotransférase » (Man-PTS)). Par la suite, elles forment des pores au niveau de la membrane plasmique, impliquant une modification de la force protomotrice ou au moins de l'un des deux composants, pour finalement causer la mort de la cellule (Dortu et Thonart, 2009). Pour les bactériocines de la sous-classe IIb, les deux peptides agissent en synergie. Par exemple, la Lactocine 705 est formée de deux peptides α et β . La Lactocine 705 α agit en déshydratant la membrane cible, ce qui permet à la Lactocine 705 β d'y créer des pores (Castellano *et al.*, 2007).

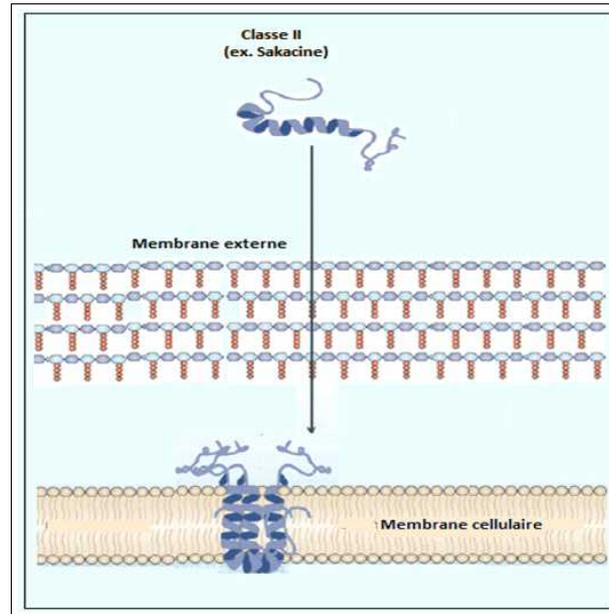


Figure 1.5 Mode d'action d'une bactériocine non-lantibiotique de la classe IIa, la Sakacine (Cotter *et al.*, 2005).

Les bactériocines à haut poids moléculaire se distinguent des autres classes par leur mode d'action. En effet, elles agissent par hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des microorganismes cibles. Ces mécanismes restent encore mal connus à ce jour. Ceci provoque la destruction de la membrane cellulaire et la mort de la bactérie cible (Dortu et Thonart, 2009) (**Figure 1.6**).

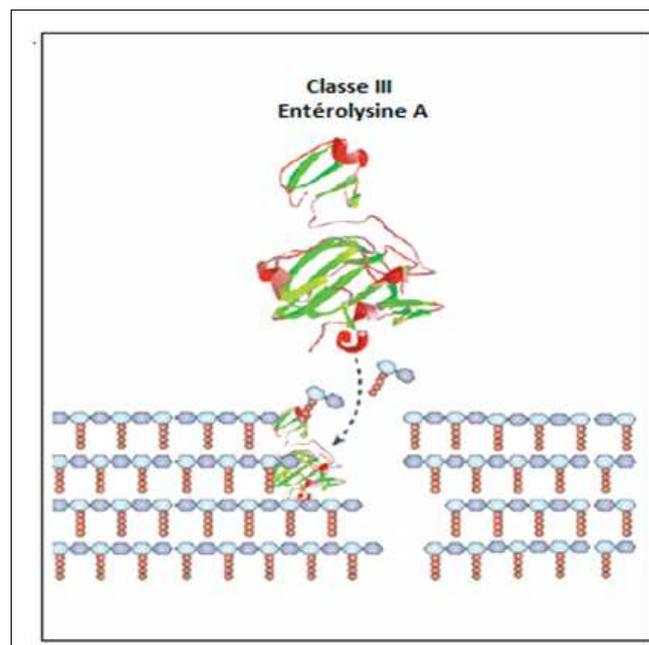


Figure 1.6 Mode d'action d'une bactériocine de la classe III, l'Entérolysine A (Cotter *et al.*, 2005).

De part leurs modes d'action, les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des agents non toxiques pour les cellules eucaryotes (membrane de composition différente). De plus, elles sont sensibles aux protéases digestives telles que la trypsine et l' α -chymotrypsine et ont une grande tolérance aux traitements thermiques ainsi qu'aux changements de pH. Agissant principalement sur les microorganismes phylogénétiquement proches des espèces productrices (telles que les espèces appartenant au genre *Listeria*, *Bacillus*, ...), elles ont un spectre d'activité précis (chaque souche productrice présentant des mécanismes d'autoprotection contre sa propre bactériocine (Schillinger *et al.*, 1996)). Toutes ces raisons font des bactériocines un moyen important pour la biopréservation des denrées alimentaires. L'objectif des recherches actuelles est donc de sélectionner des souches de LAB productrices de bactériocines. Cette production peut être accentuée en fonction des conditions environnementales et des éléments nutritifs apportés.

1.1.3.3 Régulation de la production de bactériocines par le système de « Quorum Sensing »

La production de bactériocine est souvent sous le contrôle d'un système de « Quorum Sensing » (QS) qui est un mécanisme largement présent chez les bactéries lactiques (Kuipers *et al.*, 1998). Ces bactéries se comportent comme des microorganismes simples lorsque les densités cellulaires sont faibles. Toutefois, elles peuvent changer leur comportement en un type « multicellulaire » en détectant que la densité de population a atteint un seuil critique (Kalia, 2013). À ce stade, les cellules communiquent par le biais de petites molécules chimiques d'induction qui sont synthétisées et sécrétées dans le milieu. Elles utilisent des systèmes de détection spécifiques à la concentration de ces molécules inductrices, les bactéries environnantes peuvent alors percevoir la densité cellulaire. Lorsque la concentration de la molécule signal atteint un seuil critique, l'expression des gènes et, par conséquent, le comportement de la population totale sont modifiés (Boyen *et al.*, 2009). La concentration externe des molécules auto-inductrices augmente en fonction de la densité cellulaire de la population (Waters et Bassler, 2005). En conséquence, les molécules d'induction sont liées à leurs récepteurs sur les cellules bactériennes et l'expression du gène de la population totale est modifiée et synchronisée.

Ce phénomène de communication QS a été détecté à travers un large éventail de signaux tels que :

- (i) les N-acylhomosérine lactones (AHL) produites par plus de 70 espèces de bactéries Gram-négatives, qui diffusent à travers la membrane cellulaire et se lient à des protéines de régulation à l'intérieur de la cellule ;

- (ii) des oligopeptides auto-inducteurs (AIPs) chez les bactéries Gram-positives, qui fonctionnent à travers le récepteur histidine kinase lié à la membrane (Amara *et al.*, 2010 ; Waters et Bassler, 2005) ;
- (iii) les furanosyl borate (auto-inducteurs, IA-2).

Les bactéries lactiques Gram-positives utilisent principalement des oligopeptides post-traductionnels modifiés comme étant des molécules d'induction de QS (Lyon et Novick, 2004). Ces polypeptides auto-inducteurs (AIPs) sont synthétisés dans le cytoplasme sous forme des peptides précurseurs, puis modifiés et transportés vers l'environnement extracellulaire (Lyon et Novick, 2004). La détection des AIPs se fait par des systèmes de détection à deux composants de nature récepteur histidine kinase liés à la membrane (Waters et Bassler, 2005) : ces systèmes de détection sont relayés par une cascade de phosphorylation qui influence l'activité d'une protéine régulatrice de la transcription de l'ADN (Lyon et Novick, 2004 ; Waters et Bassler, 2005). Les signaux peptidiques ne sont pas diffusibles dans la membrane, par conséquent la libération du signal est réalisée par les exportateurs oligopeptides spécifiques (Waters et Bassler, 2005).

Les phénomènes de « Quorum Sensing » sont largement présents chez les bactéries lactiques et sont notamment impliqués dans la production de peptides d'antimicrobiens, soit des lantibiotiques, soit des peptides linéaires. Ces réseaux d'autorégulation constituent une excellente base pour le développement de systèmes d'expression de gènes inductibles (Kuipers *et al.*, 1998).

Chez les bactéries lactiques deux principaux types d'antimicrobiens peptidiques sont rencontrés, à savoir les peptides modifiés de manière post-traductionnelles comme les lantibiotiques appartenant à la classe I et les peptides linéaires appartenant à la classe II des bactériocines (Klaenhammer, 1993). Dans le cas des lantibiotiques, c'est la bactériocine elle-même qui joue le rôle des molécules d'induction (cas de la Nisine décrit au paragraphe 1.1.3.4) (Kuipers *et al.*, 1995 ; Kleerebezem *et al.*, 1997), alors que pour les bactériocines linéaires et d'autres peptides apparentés à des bactériocines, il a été trouvé que plusieurs gènes pouvaient être induits (Eijsink *et al.*, 1998).

1.1.3.4 Conditions optimales de production de bactériocines par des LAB

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.

Une bonne production de bactériocines a été observée quand la croissance a lieu entre 25 et 30°C (Enan *et al.*, 1996 ; Matsusaki *et al.*, 1996 ; Todorov *et al.*, 2011), alors que les températures optimales de croissance pour les LAB se situent plutôt entre 30 et 37°C. Par exemple, la souche *Lactobacillus plantarum* ST16Pa produit sa bactériocine associée de 6,5 kDa jusqu'à atteindre un taux de 51 200 UA.mL⁻¹ au bout de 24 h lors d'une culture dans MRS à 26°C ou 30°C. Par contre, à 37°C ou 15°C dans les mêmes conditions, les concentrations en bactériocines diminuent de façon importante pour atteindre 200 UA.mL⁻¹ après 24 h à 37°C ou après 120 h à 15°C (Todorov *et al.*, 2011).

Le pH optimal du milieu varie d'une bactériocine à une autre. Il est toujours compris entre 5,5 et 6,5 et une variation de 0,5 peut entraîner une importante diminution de la production de bactériocines (Todorov *et al.*, 2011).

Le milieu de culture MRS (**Tableau 1.6**) reste le plus adapté pour la production de bactériocines (Sharma *et al.*, 2010). Les milieux BCC ou encore M17 engendrent une production de bactériocines faible voire nulle (Enan *et al.*, 1996 ; Todorov et Dicks, 2004 ; Todorov et Dicks, 2006 ; Todorov *et al.*, 2011).

Tableau 1.6 Composition du milieu MRS (Biokar, France).

<i>Composants</i>	<i>Quantité (g.L⁻¹)</i>	<i>Composants</i>	<i>Quantité (g.L⁻¹)</i>
Polypeptone	10,00	Phosphate dipotassique	2,00
Extrait de viande	10,00	Acétate de sodium	5,00
Extrait autolytique de levure	5,00	Citrate d'ammonium	2,00
Glucose	20,00	Sulfate de magnésium	0,20
Tween 80	1,08	Sulfate de manganèse	0,05

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6,4 ± 0,2

Les diverses peptones, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles. Le tween 80 (mélange d'esters oléiques) est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes. Le phosphate dipotassique permet de stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne. Même si ce milieu semble convenir pour la production de bactériocines, plusieurs publications relatent des essais à partir du milieu MRS auquel des modifications ont été apportées pour optimiser la production de bactériocines. Pour les sources de glucides, le glucose et le maltose sont les sources qui donnent les meilleures productions de bactériocines (Todorov et Dicks, 2004 ; Todorov et Dicks, 2006). Par contre, lorsque le glucose est remplacé par du fructose ou lactose, cela entraîne une diminution de la production

(Todorov *et al.*, 2011). Mais il est difficile de faire de ces observations des règles générales, chaque souche de LAB répond différemment aux modifications du milieu. Par exemple, si la concentration de glucose est augmentée, pour certaines souches, la production de bactériocines est identique à celle obtenue avec une concentration en glucose classique (Todorov et Dicks, 2004). Alors que pour d'autres, cela entraîne une augmentation de la production (Abo-Amer *et al.*, 2008 ; Todorov *et al.*, 2011) et pour d'autres encore, cela entraîne une diminution (Todorov et Dicks, 2006). En ce qui concerne la source d'azote, l'ajout de tryptone semble augmenter les performances de production. Les autres éléments du milieu, notamment les sels restent essentiels pour la production de bactériocines (Todorov *et al.*, 2011).

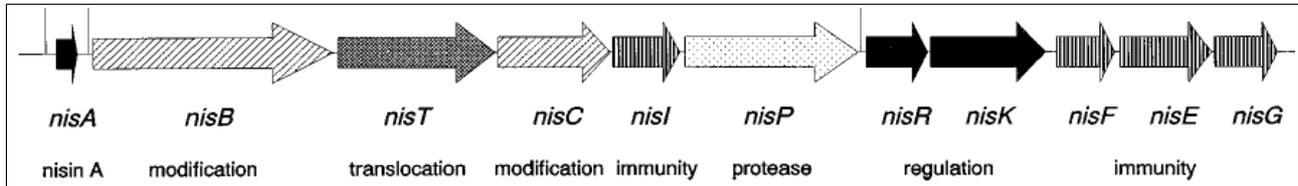
En dehors des composés classiques du milieu, il est intéressant d'étudier les phénomènes d'autoinduction. En prenant l'exemple de la nisine, il est possible d'après certains travaux d'augmenter la production d'antimicrobien (nisine) par ajout de nisine. En effet, la nisine autorégule sa production grâce à un système de deux composants *nisK/nisR*. Onze gènes (*nisABTCIPRKFE*G) organisés en cluster sont impliqués dans la synthèse de la nisine (**Figure 1.7. Partie A**). Parmi ces gènes :

- *nisA* code pour le peptide précurseur de la nisine A composés de 57 acides aminés ;
- *nisB* et *nisC* codent pour des enzymes jouant un rôle dans les modifications post-traductionnelles ;
- *nisT* code pour une protéine de transport ;
- *nisP* code pour une protéase extracellulaire (impliquée dans la transformation des précurseurs) ;
- *nisI* code pour une lipoprotéine impliquée dans la protection de la cellule productrice vis-à-vis de la nisine ;
- *nisF*, *nisE*, *nisG* codent pour des protéines de transport et sont impliqués aussi dans le mécanisme d'immunité.

La **Figure 1.7. Partie B** décrit le modèle de biosynthèse et de régulation de la nisine d'après les travaux de Kuipers *et al.*, 1995. Dans un premier temps, *nisK* détecte la présence de la nisine dans le milieu et s'autophosphoryle. Dans un second temps, le groupement phosphate est transféré à *nisR* qui agit comme un activateur de la transcription, suivi de la synthèse de l'ARN_m, de la synthèse ribosomique du précurseur de la nisine et de la synthèse de protéines. A l'étape 3, le précurseur est modifié par les enzymes *nisS* et *nisC*. Ensuite le précurseur de la nisine entièrement modifié est

transporté à travers la membrane par le tansporteur *nisT*. *NisP* finit la modification du précurseur de la nisine à l'extérieur de la cellule pour aboutir à la libération de la nisine active. *NisI*, en collaboration avec *nisF*, *nisE* et *nisG*, protègent la cellules de l'action bactéricide de la nisine.

A



B

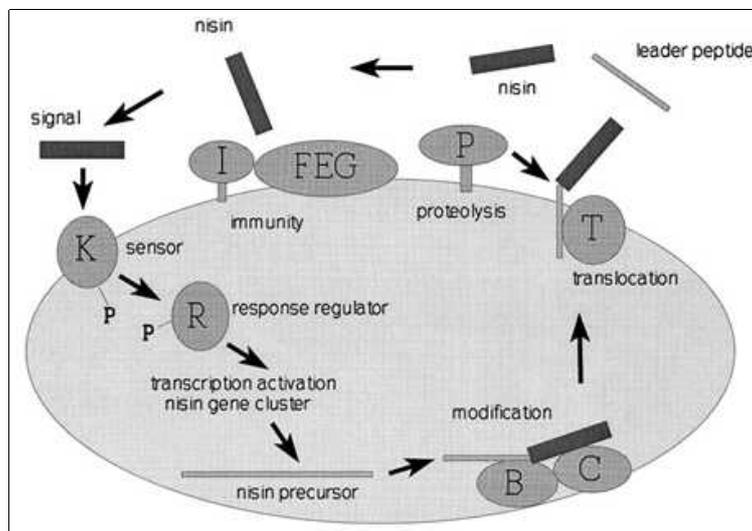


Figure 1.7 Partie A : Cluster de gènes impliqués dans la synthèse de la nisine chez *Lactococcus lactis*.

Partie B : Modèle décrivant la synthèse et la régulation de la nisine chez *Lactococcus lactis* (d'après Kuipers *et al.*, 1995).

Des quantités très faibles de nisine sont nécessaires pour cette autoinduction (1 à 50 ng/mL) (Kuipers *et al.*, 1995). Cette dernière a été observée par Mall *et al.*, en 2010, pour la souche de *Lactococcus lactis* MTCC440. Pour une même composition de milieu sous agitation et à 30°C, ils ont montré qu'il était possible d'augmenter la production de nisine en ajoutant une petite quantité de nisine initialement dans le milieu. Pour obtenir le meilleur rendement, la quantité initiale à ajouter est de 0,15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour cette souche et dans les conditions utilisées. Cette quantité initiale de nisine est donc responsable de l'induction de l'autophosphorylation de *nisK* déclenchant le processus cellulaire de production de nisine selon le mécanisme décrit précédemment.

1.1.3.5 Utilisation des bactériocines en industrie agroalimentaire

A ce jour, l'application des bactériocines dans le secteur agroalimentaire pour la biopréservation 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.

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). Ce lantibiotique 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 Pédiocine (ALTA™ 2341, Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Irlande) (Dortu et Thonart, 2009) et la Jensiine 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 « FDA ». 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'Entéroccine 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 1.7 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
	Entérocoque 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
	Entérocoque 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
	Entérocoque 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
	Entérocoque 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

De plus, dans le cas des applications, il faut au préalable s'intéresser aux facteurs intrinsèques de l'aliment qui pourraient influencer les capacités antimicrobiennes des bactériocines. La stabilité des capacités antimicrobiennes des bactériocines dépend de plusieurs facteurs.

(i) La composition de l'aliment

Les bactériocines peuvent interagir avec certains additifs alimentaires ou des ingrédients. Le pH peut également inhiber leur action et des protéases peuvent dégrader les bactériocines. Par exemple, l'application de Nisine dans des viandes doit faire face à plusieurs limitations : ses interactions avec les phospholipides, sa solubilité réduite à un pH = 6,0 et son inactivation par formation de complexes Nisine-Glutathion (Gálvez *et al.*, 2007).

(ii) Les microorganismes présents dans l'aliment

Une concentration trop importante de microorganismes dans l'aliment peut rendre la bactériocine inefficace. L'effet des bactériocines peut également être réduit à cause de la présence de microorganismes résistants à la molécule ou formant des spores. De plus, certains microorganismes peuvent produire des protéases qui vont hydrolyser les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

(iii) Les traitements appliqués

Des traitements thermiques trop importants peuvent réduire l'activité des bactériocines ou les dégrader. La température de stockage peut aussi avoir une influence (Lücke, 2000).

L'activité optimale des bactériocines est bien évidemment essentielle pour une protection efficace. Cependant, il faut également prendre en considération la sensibilité de la flore d'intérêt par rapport aux bactériocines. En effet, l'élimination de ces microorganismes favorables risquerait de favoriser la multiplication des microorganismes altérants et/ou pathogènes. Il faut aussi prendre en considération que chaque bactériocine a un spectre d'action limité. L'utilisation combinée de plusieurs bactériocines appartenant à des classes différentes permettrait d'augmenter le spectre d'action. De plus, en l'absence d'autres méthodes de conservation, les bactériocines ont une action très limitée sur les bactéries Gram négatif. Dès lors, les bactériocines sont souvent utilisées en complément d'autres méthodes de conservation (« hurdle technology » ou technologies des barrières). Les traitements sont soit des traitements physiques (ex. traitements thermiques, conditionnement sous atmosphère modifiée ou contrôlée), soit des traitements chimiques (ex. acides organiques, huiles essentielles, chlorure de sodium, agents chélatants comme l'EDTA). Ces traitements fragiliseraient la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ce qui permettrait par

la suite l'action des bactériocines (Helander *et al.*, 1997 ; Vermeiren *et al.*, 2004) (**Figure 1.8**).

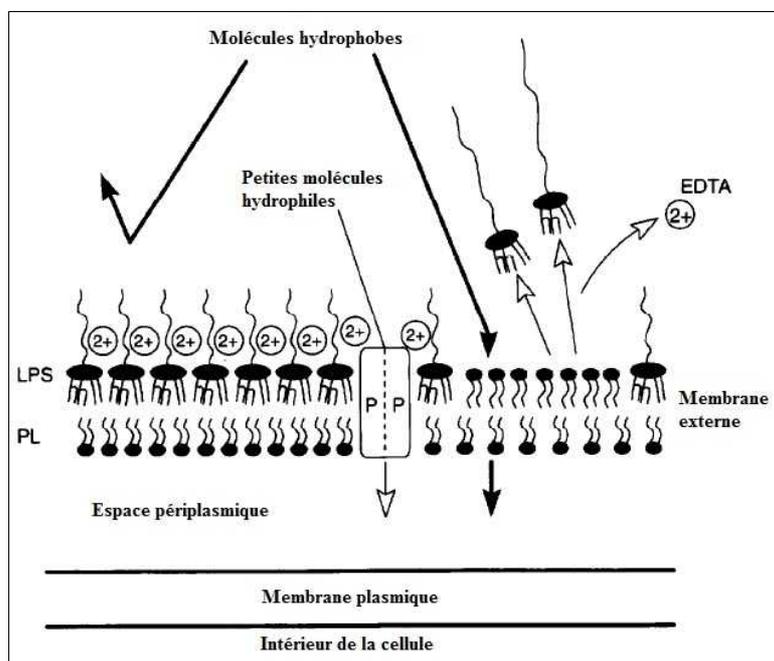


Figure 1.8 Vue schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif et intérêts des traitements multiples pour combattre les bactéries pathogènes à Gram négatif (d'après Helander *et al.*, 1997).

La membrane externe intacte (côté gauche de la figure) fonctionne comme une barrière imperméable aux molécules hydrophobes, ne permettant l'entrée que de petites molécules hydrophiles à travers les protéines de transport appelées les porines (PP). Le fait d'enlever les cations divalents stabilisateurs de la couche de lipopolysaccharides (LPS) par des agents chélatants comme l'EDTA provoque le décrochage des LPS et met à jour la surface de la membrane externe composée de phospholipides (PL). Alors les composés hydrophobes comme la Nisine peuvent traverser la membrane externe et atteindre leurs sites d'action sur la membrane plasmique.

Une solution alternative aux méthodes décrites précédemment pourrait être l'incorporation de bactéries vivantes productrices de bactériocines dans les emballages alimentaires. En effet, les bactéries incorporées dans la matrice de l'emballage synthétiseraient et relargueraient au fur et à mesure leurs substances antimicrobiennes à la surface de l'aliment. De plus, les mécanismes antimicrobiens seraient multiples : compétition nutritionnelle et pour l'espace, acidification, production de métabolites antimicrobiens (bactériocines, peroxydes, ...). Cela pourrait limiter le phénomène de résistance des souches cibles. Un troisième intérêt serait d'obtenir une réponse antimicrobienne plus appropriée. En effet, la croissance et l'activité métabolique des LAB sont favorisées par les mêmes facteurs environnementaux (remontée en température et/ou humidité, présence de substrats de croissance) que ceux qui stimulent le développement de flores pathogènes ou d'altération. Par exemple, lors d'une rupture de la chaîne de froid, le métabolisme des LAB se déclencherait et la diffusion des antimicrobiens interviendrait à un moment plus ciblé. Enfin, les

étapes de production, récupération, purification, incorporation de la bactériocine seraient supprimées. Quelques travaux sont déjà parus s'inspirant de l'encapsulation de LAB dans des gels développés dans le domaine des probiotiques (Bevilacqua *et al.*, 2010), ou encore de l'immobilisation utilisée pour les fermentations en réacteurs, allant jusqu'à incorporer des cellules à des films secs (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2013 ; Concha-Meyer *et al.*, 2011 ; Gialamas *et al.*, 2010). Ces travaux sont discutés par la suite dans la partie « 1.2 Les systèmes d'immobilisation ».

1.1.4 Mises en évidence des propriétés bioprotectrices des LAB

Dans ce travail, il a été choisi comme principal genre cible *Listeria*. En effet, depuis une dizaine d'années, notamment dans les pays développés, il y a une recrudescence d'infection par *Listeria* (principalement *monocytogenes*) (agent étiologique de la Listériose) après consommation d'aliments contaminés. Par exemple, Goulet *et al.*, 2008, rapportent qu'en France les cas de Listériose ont diminué entre 1999 et 2005 de 4,5 à 3,5 cas par million d'habitants. En 2006, ils observaient une ré-augmentation jusqu'à à 4,7 cas par million d'habitants. Aux États-Unis, *L. monocytogenes* est responsable d'environ 2 500 cas de Listériose par an avec un taux de 91 % d'hospitalisations et de 20 % de mortalité (Nelson *et al.*, 2004). Ce pathogène reste le danger le plus critique de notre approvisionnement alimentaire. *L. monocytogenes* peut être détectée dans une grande variété de produits crus ou transformés. Lait, produits laitiers, viandes (fermentées ou non), produits de la mer ont tous été associés au moins une fois à des contaminations par *Listeria* (Gandhi et Chikindas, 2007). De plus, les consommateurs se sont tournés vers des aliments dits « prêts à consommer » (ou « Ready To Eat » en anglais, RTE) ayant subi peu de traitements de stabilisation pour préserver au mieux leurs qualités organoleptiques. La consommation d'aliments RTE conservés une ou plusieurs semaines est devenue une importante source d'infection (Lambertz *et al.*, 2012). Par exemple, *L. monocytogenes* a été détectée par Lambertz *et al.*, 2012, dans :

- environ 2 échantillons de fromages parmi 525,
- 6 échantillons de viandes parmi 507,
- un peu plus de 66 échantillons de poissons parmi 558.

1.1.4.1 Le risque *Listeria* dans le domaine agroalimentaire

Le genre *Listeria* contient 6 espèces : *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* et *L. grayi* (Ryser et Marth, 2007). Généralement, *L. monocytogenes* est

le pathogène majeur pour l'homme (McLauchlin *et al.*, 2004). *Listeria* forme des bacilles réguliers Gram positif, ayant une petite taille (0,5 µm de diamètre / 1 à 2 µm de longueur). Douze sérotypes ont été identifiés chez *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7). En France, les souches isolées de cas de listériose humaine appartiennent le plus souvent au sérotype 4b ou au sérogroupe 1/2 (Rocourt, 1991 ; Nelson *et al.*, 2004). Le sérotype 1/2a est le plus souvent isolé dans l'environnement agro-alimentaire (Kathariou, 2002). Mais elle n'envahit pas que des aliments, elle est aussi capable de coloniser les équipements des chaînes de production, les surfaces de travail (Little *et al.*, 2007 ; Carpentier et Cerf, 2011).

Les personnes âgées, les femmes enceintes, les nouveau-nés, les jeunes enfants et les personnes immunodéprimés sont les sujets les plus sensibles à la listériose (Bonnet et Montville, 2005). Cette infection grave d'origine alimentaire a un temps d'incubation assez long (pouvant s'étendre de quelques jours à deux mois), ce qui ajoute une difficulté pour identifier le pathogène et tracer l'aliment contaminé (Gandhi et Chikindas, 2007). Une fois que l'agent pathogène a réussi à pénétrer dans les cellules par phagocytose, il est libéré de la vacuole et commence à se multiplier. Il peut se déplacer à l'intérieur des cellules pour finalement passer de cellule en cellule et infecter de nombreux tissus ; le foie reste néanmoins le principal site de l'infection (Gandhi et Chikindas, 2007). La maladie se traduit généralement par une méningite, une septicémie ou d'autres infections du système nerveux central. Pour les femmes enceintes, la listériose peut engendrer des avortements spontanés, des naissances prématurées, des morts fœtales, ... (Rocourt et Cossart, 1997)

La difficulté de combattre *L. monocytogenes* réside dans le fait que ce germe est ubiquitaire. *L. monocytogenes* est un microorganisme psychrotrophe, elle peut se développer dans une gamme de température allant de 45°C jusqu'à des températures inférieures à 0°C de quelques degrés (-2 à -4°C) (Carpentier et Cerf, 2011). Par exemple, une durée de réfrigération trop importante est une excellente phase d'enrichissement sélectif pour *Listeria*. En effet, si *Listeria* est présente initialement, elle aura les capacités de survivre que n'auront pas les autres souches et sera la seule souche à se maintenir (Buchrieser *et al.*, 2006). Son développement est optimal pour des températures comprises entre 30 et 37°C. Elle est présente dans les plantes, les sols, les eaux usées, les ensilages, les déchets d'abattoirs, ... (Farber et Peterkin, 1991). Ses exigences nutritives sont modérées. Elle se développe dans des milieux comme le bouillon tryptone soja («Tryptone Soy Broth, TSB») ou encore le bouillon Coeur-Cerveille (Farber et Peterkin, 1991) en aéro-anaérobiose

et en micro-aérophilie. Sa capacité à s'adapter et à survivre dans des environnements extrêmes (forte concentration en sel (10 % NaCl), large gamme de pH de 4,5 à 9,0, large gamme de température, faible activité de l'eau jusqu'à 0.92) est très importante (Buchrieser *et al.*, 2006 ; Carpentier et Cerf, 2011). Farber et Peterkin, en 1991, ont traité 4 souches de *L. monocytogenes* avec des acides qui peuvent être utilisés en agroalimentaire : l'acide acétique, l'acide citrique et l'acide chlorhydrique. L'acide acétique est celui qui a montré l'effet le plus inhibiteur. De même, ces auteurs ont déterminé les pH minimum initiaux pour qu'il y ait croissance : de 5,0 à 5,7 à 4°C et, de 4,3 à 5,2 à 30°C. Une des forces de *L. monocytogenes* est sa capacité à s'adapter à ces environnements extrêmes. Plusieurs équipes ont pu mettre en évidence un système de Réponse de Tolérance à l'Acide (RTA) (O'Driscoll *et al.*, 1996 ; Bonnet et Montville, 2005 ; Cataldo *et al.*, 2007). Cette résistance est acquise lors d'une première exposition à des conditions moyennement acides (pH 5,5, acide lactique à 1 M) (Gandhi et Chikindas, 2007) et permet ensuite aux cellules de *Listeria monocytogenes* de résister à des conditions acides létales (pH 3,5). Il est intéressant, mais pas surprenant, de noter que l'induction de ce mécanisme dépend de l'acide utilisé pour la première exposition. Par exemple, une première exposition de la souche *L. monocytogenes* Scott A à l'acide chlorhydrique n'induit pas de RTA contrairement à l'exposition à l'acide acétique (Bonnet et Montville, 2005). Cette observation serait due aux différences de constantes de dissociation des deux acides qui n'ont donc pas le même effet antimicrobien sur *Listeria*. De plus, l'induction d'une RTA peut aussi lui apporter des protections contre d'autres stress : stress thermique, présence d'éthanol, stress osmotique (O'Driscoll *et al.*, 1996). Toutes ces caractéristiques font de *L. monocytogenes* un microorganisme difficile à contrôler.

Ce type d'adaptation est un risque réel pour, par exemple, le contrôle de contaminations alimentaires. Un des avantages d'utiliser des cellules entières de LAB dans les systèmes bioprotecteurs est le large spectre d'antimicrobiens produits. Cela permet d'éviter l'adaptation des microorganismes cibles (Zhou *et al.*, 2013).

1.1.4.2 Tests antimicrobiens

Les espèces *L. innocua* et *L. monocytogenes* sont très proches (Czajka *et al.*, 1993 ; Buchrieser *et al.*, 2006). Cela permet dans de nombreuses études d'utiliser, dans un premier temps, *L. innocua*, qui est non pathogène, comme modèle.

L'activité antagoniste d'une souche de LAB vis-à-vis d'une souche cible peut être mise en évidence en milieu liquide ou en milieu gélosé. Le choix est souvent fait selon l'application qui est envisagée

par la suite. Pour une application de protection alimentaire ou de surface, le milieu gélosé sera privilégié (Ryan *et al.*, 1996). Pour un travail d'optimisation de la production de bactériocines dans le domaine des biotechnologies ou pour la compréhension des modes d'action des bactériocines, des tests en milieu liquide seront mis en œuvre (Van de Guchte *et al.*, 2001 ; Bendali *et al.*, 2008 ; Héquet *et al.*, 2009 ; Dal bello *et al.*, 2012). Les souches cibles sont également choisies en fonction de l'application finale et du contexte de l'étude : *Listeria* sp., *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., ...

En milieu gélosé, les tests réalisés sont des méthodes de diffusion en puits (Moreno *et al.*, 2000 ; Sharma *et al.*, 2010 ; Castro *et al.*, 2011 ; Jiang *et al.*, 2012) ou en spots (Alpay-Karaoglu *et al.*, 2003 ; Mataragas *et al.*, 2003 ; Trias *et al.*, 2008 ; Hartmann *et al.*, 2011). La souche cible est inoculée dans la gélose, le surnageant de culture de LAB préalablement recueilli ou la culture entière de LAB est déposé(e) dans des puits formés dans la gélose ou en spots à la surface de la gélose. Après développement de la souche cible, des zones d'inhibition sont relevées pour les surnageants ou cultures entières de LAB bioprotectrices (**Figure 1.9**).

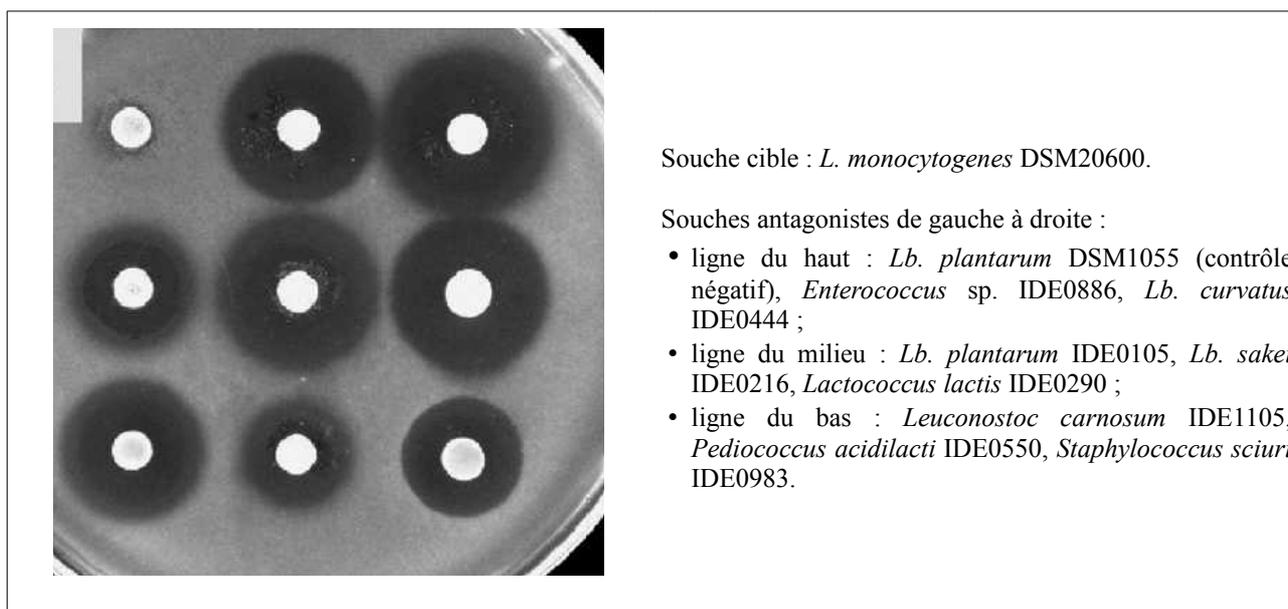


Figure 1.9 Résultats d'inhibition de différentes souches antagonistes par un test en milieu gélosé de diffusion en spots (dépôt des cultures entières) (d'après Hartmann *et al.*, 2011).

En milieu liquide, les surnageants de culture de LAB sont testés directement en les ajoutant à la culture liquide de la souche cible. La croissance de la souche cible est suivie par mesure de la densité optique. Ces mesures peuvent se faire à l'aide d'un appareil de Bioscreen©, système de

microcuvettes permettant de traiter 200 échantillons simultanément. L'activité antimicrobienne est révélée par l'absence de l'augmentation de la densité optique et donc la non croissance de la souche cible.

1.1.4.3 Méthodes d'identification des métabolites antimicrobiens des LAB

Pour déterminer la nature des molécules antimicrobiennes produites par des LAB bioprotectrices, les mêmes tests que précédemment sont réalisés avec des surnageants préalablement traités. Pour éliminer l'effet du pH, les surnageants de culture sont neutralisés. Ensuite ce surnageant neutralisé peut subir des traitements thermiques (ex. 60, 70, 80, 90, 100 ou 121°C pendant 10 (Alpay-Karaoglu *et al.*, 2003) à 30 min (Jiang *et al.*, 2012)) pour mettre en évidence la thermostabilité des actifs antimicrobiens. Le surnageant peut être traité par différentes enzymes. Un premier traitement enzymatique avec la catalase peut être réalisé pour étudier l'effet des peroxydes. Pour étudier la nature peptidique, le surnageant neutralisé est soumis à des traitements enzymatiques avec des enzymes protéolytiques à spectre généralement assez large parmi la trypsine (coupure au niveau des résidus acides aminés (aa) basiques (Lys, Arg)), l' α -chymotrypsine (coupure au niveau des résidus aa aromatiques (Phe, Tyr, Tryp) ou à longue chaîne hydrophobe (Met, Leu)), la protéinase K (coupure au niveau des résidus aa aromatiques), la papaïne (coupure au niveau des résidus aa hydrophobes), la pepsine (coupure au niveau des résidus aa aromatiques) (Ryan *et al.*, 1996 ; Moreno *et al.*, 2000 ; Hartmann *et al.*, 2011 ; Castro *et al.*, 2011 ; Jiang *et al.*, 2012). Lorsque l'activité antimicrobienne du surnageant est perdue après traitement aux enzymes protéolytiques, la nature peptidique des agents antimicrobiens est démontrée. La Nisine serait par exemple sensible à l' α -chymotrypsine et à la protéinase K, et résistante à la trypsine, la papaïne et la pepsine (Rodriguez *et al.*, 1995 ; Ryan *et al.*, 1996 ; Noonpakdee *et al.*, 2003 ; Bonnet et Montville, 2005). Pour déterminer partiellement ou exactement la nature de ces agents, ces molécules sont alors purifiées et analysées (**Figure 1.10**).

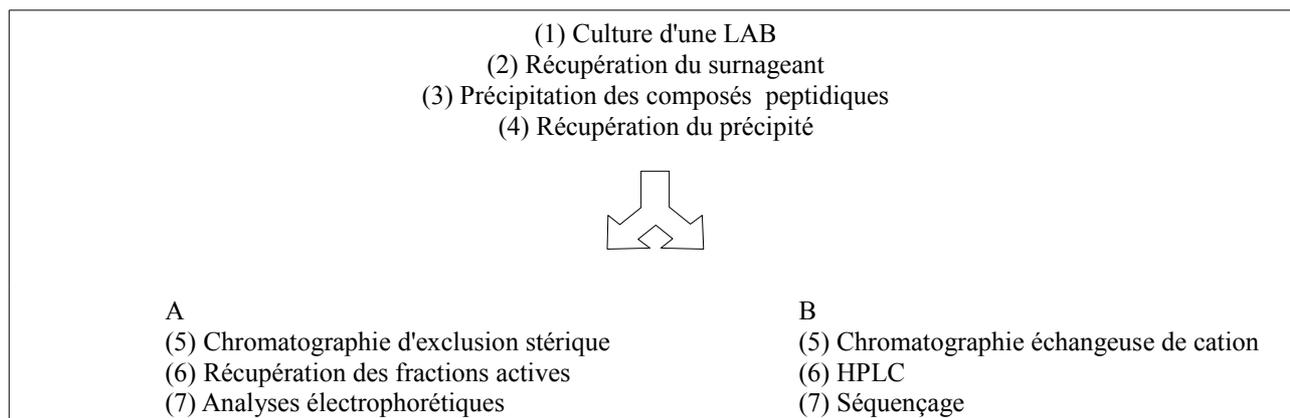


Figure 1.10 Stratégies (A) pour une purification partielle de bactériocine ou (B) menant jusqu'au séquençage (d'après Boris *et al.*, 2001 ; Héquet *et al.*, 2007 ; Da Silva Malheiros *et al.*, 2012).

1.2 Les systèmes d'immobilisation

Les matrices d'immobilisation de molécules biologiques (actifs thérapeutiques, arômes, bactéries, ...) qui sont développées sont généralement à base de polymères (polyosides ou protéines) traditionnellement utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme stabilisants, épaississants, gélifiants ou encore dispersants. Dans le cas des cellules bactériennes, plusieurs pistes peuvent être envisagées : films secs, encapsulation (support à un polymère), structures à base de mélange de plusieurs polymères. Le choix se fait généralement pour l'une ou l'autre possibilité selon le domaine d'application.

1.2.1 Les films secs

Concha-Meyer *et al.*, en 2011, ont présenté une étude sur l'incorporation de cellules de LAB viables dans un film à base d'amidon et d'alginate de sodium, puis après séchage, ils ont suivi la viabilité des LAB et l'activité antimicrobienne de ces films à la surface d'un aliment réel, du saumon, à 4°C. À la surface du saumon, ils ont observé un maintien de l'inhibition sur 21 jours pour le cocktail de deux souches de LAB, et 28 jours pour le cocktail de deux souches de LAB accompagné de nisine. Le nombre de cellules de LAB a été stationnaire au cours de l'expérimentation (certains nutriments ont pu diffuser du saumon vers les LAB) sans variation du pH dans la zone de contact film/saumon.

En 2010, une autre publication allait déjà dans ce sens. En incorporant des cellules de *Lactobacillus*

sakei LQC 1089 (souche isolée à partir de viande) dans un film comestible de caséinates (directement dans la solution filmogène ou par pulvérisation), une réduction de la souche pathogène, *Listeria monocytogenes* SCOTT A, de 3 log a été observée après 12 jours à 4°C sur gélose et sur un système modèle pour la viande fraîche (Gialamas *et al.*, 2010).

Tout récemment en 2013, Sanchez-Gonzalez *et al.*, ont confiné des cellules de *Lactobacillus plantarum* (Primacol[®], Lacer, Espagne), à une concentration initiale de 5 log UFC.cm⁻², dans des films comestibles de caséinate de sodium (CS), de protéine de pois (PP), de méthylcellulose (MC) et d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). Les films ont été fabriqués par « casting », séchés à 25 ou 37°C et ont été conservés à 5°C à une humidité relative de 75 % (conditions de stockage similaires à celles des fromages ou des viandes) pendant 30 jours. Ils ont suivi la viabilité des cellules, la production de bactériocines, l'activité anti-*Listeria innocua* CECT910 et étudié les propriétés mécaniques et de perméabilité des films. Bien que la viabilité des cellules de *Lb. plantarum* ait été meilleure dans les films à base de protéines (plus de 90 % de la population initiale a été maintenu à la fin du temps de conservation), la production de bactériocine a été retardée par rapport aux films à base de cellulose. Dans ces derniers, le taux de bactériocine est plus élevé au départ ayant pour conséquence une activité antimicrobienne initiale plus importante. En fonction de l'hydrocolloïde utilisé, les propriétés antimicrobiennes en fonction du temps sont donc différentes. Par la suite, il faudra trouver l'application en adéquation avec les propriétés du film.

1.2.2 L'encapsulation, une méthode développée dans le domaine des probiotiques et des productions en réacteurs

La technologie de l'encapsulation des bactéries probiotiques a évolué avec les technologies utilisées par l'industrie des biotechnologies. La procédure la plus couramment reportée pour l'encapsulation dans le domaine des probiotiques est la formation de microcapsule (avec un diamètre compris entre 0,3 et 3,0 mm) par extrusion ou émulsion en gélifiant par traitement thermique (carraghénane, agarose, gélatine, gomme gellane) ou par ajout d'ions (alginate, chitosan) (Kailasapathy, 2002 ; Doleyres et Lacroix, 2005 ; Lacroix et Yildirim, 2007 ; Petrovic *et al.*, 2007). Par la suite, les chercheurs s'intéressent à la viabilité des cellules probiotiques encapsulées en reconstituant les conditions rencontrées dans le tractus gastro-intestinal de l'Homme. Le **Tableau 1.8** suivant présente quelques publications avec la référence de la souche immobilisée et le polyside utilisé.

Tableau 1.8 Encapsulation de bactéries probiotiques.

Souche immobilisée	Polyoside utilisé	Auteurs
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> KFRI 673	Alginate de sodium avec un revêtement avec du chitosane	Lee <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus casei</i> NCDC-298	Alginate de sodium	Mandal <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 43121	Alginate de sodium	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Alginate de sodium avec un revêtement avec du lactosérum	Gbassi <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Alginate de sodium	Aslim et Alp, 2009

Certains chercheurs ont aussi proposé d'enrober leurs capsules avec un revêtement (Lee *et al.*, 2004). Les revêtements sembleraient protéger les cellules des conditions acides du tractus gastro-intestinal et donc augmenter la viabilité de ces dernières.

Picot et Lacroix, en 2004, ont quant à eux utilisé des matières grasses du lait et du lactosérum pour former des microcapsules par émulsion pour protéger des souches de probiotiques. La viabilité des cellules de la souche *Bifidobacterium breve* R070 encapsulées avec le lactosérum a été significativement plus importante que celle des cellules libres après 28 jours de stockage à 4°C dans un yaourt et après expositions successives aux liquides gastrique et intestinal modèles.

Dans le domaine des biotechnologies, les objectifs sont différents mais les procédés d'encapsulation sont semblables. Pour des productions d'antimicrobiens, comme la nisine, ou d'acide lactique, l'intérêt de l'encapsulation est d'augmenter le rendement en métabolite produit en augmentant la concentration cellulaire dans le réacteur (Ivanova *et al.*, 2002) ou en permettant de réutiliser les cellules pour plusieurs fermentations successives (Panesar *et al.*, 2007). Ivanova *et al.*, en 2002, ont immobilisé des cellules d'*Enterococcus faecium* dans des billes d'alginate et ils ont pu enchaîner trois cycles de production d'enterococcine équivalents (6 400 UI.mL⁻¹ après 72h) avec une viabilité des cellules accrue de 0,5 log en fin de cycle par rapport à des cellules libres. La libération de l'enterococcine des billes vers le milieu s'est faite sans difficulté. Panesar *et al.*, en 2007, ont produit de l'acide lactique avec des cellules de *Lactobacillus casei* immobilisées. La conversion du lactose n'a pas diminué sur 16 cycles successifs. Ces auteurs ont optimisé la concentration du gel pour limiter les phénomènes de résistance liée à la diffusion des entrants et des sortants, ainsi que la taille des billes. En effet, lorsque la taille des billes a été diminuée, la production d'acide lactique a augmenté. Il est connu que le rapport surface/volume est augmenté avec la diminution du diamètre des billes et que dans ce cas, les mouvements des molécules en

périphérie de la bille et à l'intérieur se font plus rapidement (Audet *et al.*, 1988 ; Panesar *et al.*, 2007).

Tableau 1.9 Encapsulation de LAB pour une utilisation en bioréacteur.

Souche immobilisée	Polyoside utilisé pour l'immobilisation	Métabolites produits	Auteurs
<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> no. 5085 <i>S. lactis</i> no. 2432	Carraghénane κ / gomme de caroube	acide lactique	Audet <i>et al.</i> , 1988
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CNRZ144 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> E8 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> X2 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CD11	Carraghénane κ / gomme de caroube	Pré-fermentation de lait UHT écrémé	Sodini <i>et al.</i> , 1997
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC 3147 <i>Lactococcus lactis</i> DPC 496	Alginate de sodium	nisine et lacticine 3147	Scannell <i>et al.</i> , 2000b
<i>Lactococcus lactis</i> IO-1	Alginate de sodium Carraghénane	nisine Z	Sonomoto <i>et al.</i> , 2000
<i>Enterococcus faecium</i> A 2000	Alginate de sodium	enterococcine	Ivanova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus casei</i> NBIMCC 1013	Pectate	acide lactique	Panesar <i>et al.</i> , 2007

Les travaux déjà publiés à propos de l'encapsulation de cellules sont donc conséquents mais peu de chercheurs se sont encore intéressés à la fois à la viabilité des cellules encapsulées et à la conservation de leurs capacités antimicrobiennes dans le cas des LAB probiotiques ou bioprotectrices. Brachkova *et al.*, en 2010, sont parmi les seuls à étudier ces propriétés. Des *Lactobacillus* spp. ont été encapsulés dans des billes d'alginate de quatre façons différentes :

- 1- à l'intérieur ;
- 2- à l'intérieur et sur la surface ;
- 3- à la surface ;
- 4- concentrées à la surface et à l'intérieur.

L'activité antimicrobienne résiduelle a été évaluée contre des souches multi-résistantes de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Pour les billes de type (2), une activité antimicrobienne comparable à celle de la culture native en milieu liquide a été observée. Dans ce cas des souches de LAB immobilisées, il semblerait donc que les agents antimicrobiens qu'elles libèrent réussissent à migrer de la bille vers l'extérieur et atteindre les souches cibles.

L'encapsulation serait donc une technique d'immobilisation qui permettrait de conserver les

capacités antimicrobiennes des LAB et les connaissances déjà acquises dans ce domaine pour d'autres applications pourraient être transposées à la problématique de la biopréservation.

Un grand nombre de publications présentent des travaux sur l'encapsulation mais peu de chercheurs se sont intéressés à l'immobilisation de cellules dans des gels autres que sous forme de billes. Bevilacqua *et al.*, en 2010 ont présenté des résultats concernant la réponse à des stress alcalins ou acides de *Lactobacillus plantarum* chargés dans un gel d'alginate. En priorité, ces auteurs ont étudié la survie des cellules. Après 30 jours, $10^{7-7,5}$ UFC.g⁻¹ sont encore viables pour des températures de stockage de 4 et 15°C. L'immobilisation de LAB dans des matrices d'alginate permet de maintenir une viabilité importante.

Ces dernières années, l'encapsulation se développe aussi à partir de systèmes plus complexes de mélanges de biopolymères (émulsion de polyside et de protéine) pour la protection et la libération de composés fonctionnels tels que les vitamines, les nutraceutiques, les composés aromatiques, ... (Matalanis *et al.*, 2011). La principale raison de cette tendance est le fait que le nombre de substances légalement autorisées pour l'industrie alimentaire est limité et l'acceptation d'un nouvel ingrédient demande un coût important et beaucoup de temps. La recherche de nouveaux assemblages à partir des mélanges de biopolymères (de qualité alimentaire) pour l'encapsulation permettrait d'accéder à une variété d'organisation structurale sans introduire de nouveaux ingrédients (Jones et McClements, 2010).

1.2.3 Structures à base de mélanges de biopolymères

Les biopolymères de qualité alimentaire (comme les protéines ou les polysides) peuvent être utilisés pour créer une gamme diversifiée de systèmes appropriés pour l'encapsulation, la protection et la libération de composés fonctionnels tels que des vitamines, des nutriments, des composés aromatiques, des antioxydants, des antimicrobiens, des nutraceutiques, ... (Matalanis *et al.*, 2011). Plusieurs comportements des mélanges de biopolymères de natures différentes peuvent être utilisés pour créer des systèmes de libération comme la coacervation ou la séparation de phase (**Figure 1.11**).

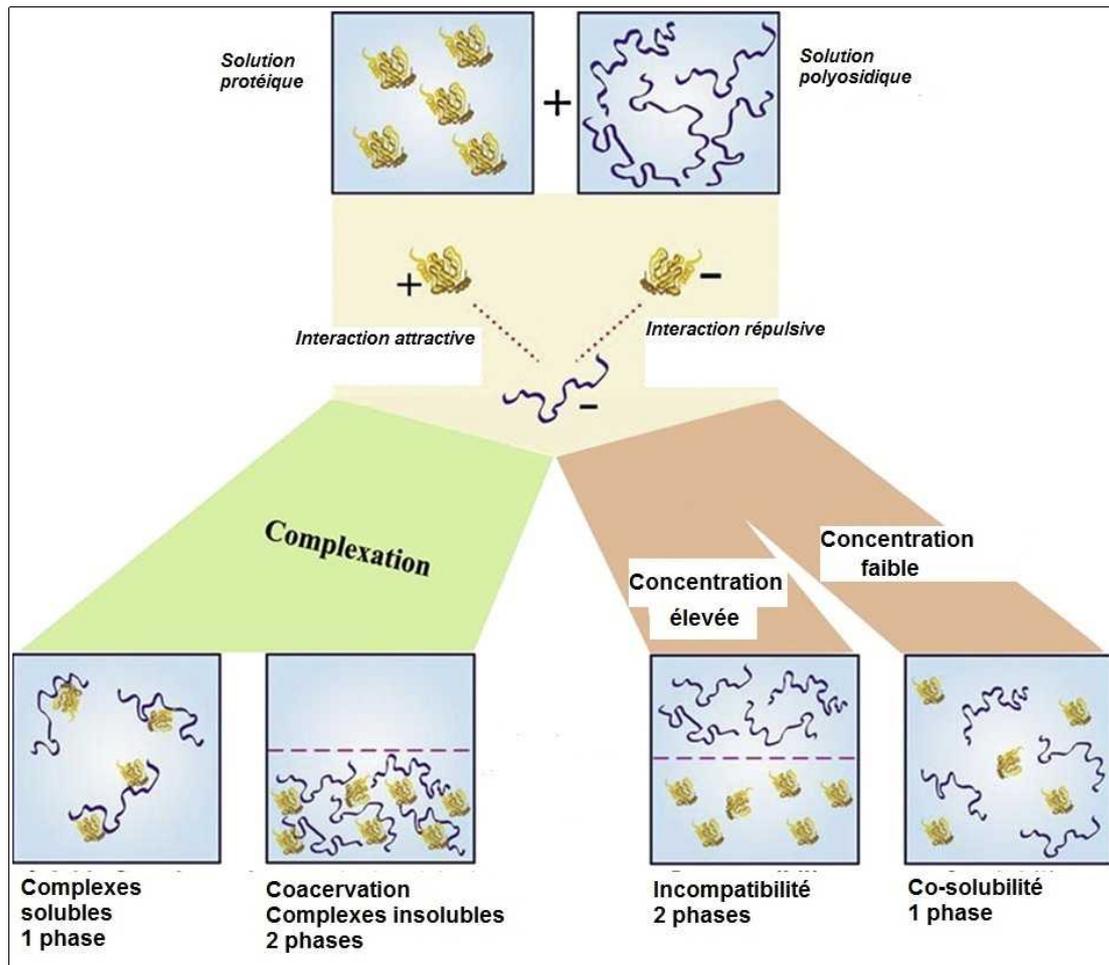


Figure 1.11 Comportements des mélanges de biopolymères protéine/polyoside (d'après Matalanis *et al.*, 2011).

Lorsqu'il y a une attraction entre les deux types de biopolymères, cela cause l'association entre eux soit sous forme de complexes solubles soit sous forme de complexes insolubles. L'exemple le plus commun de ce type résulte d'interactions électrostatiques entre molécules ayant des charges opposées. Le phénomène de complexation, appelé coacervation, correspond à la formation de deux phases distinctes : l'une est riche en biopolymères A et B et, l'autre est appauvrie en biopolymères. L'incompatibilité thermodynamique (ou ségrégation) se produit lorsque l'interaction entre les deux biopolymères est plus répulsive que l'interaction entre deux molécules A ou deux molécules B. Cela entraîne la formation de deux phases non miscibles l'une riche en A et l'autre riche en B. L'incompatibilité thermodynamique est le phénomène le plus communément rencontré pour une solution de deux biopolymères (Schorsch *et al.*, 1999 ; Tolstoguzov, 2003) et une importante variété de microstructures peut être obtenue (Matalanis *et al.*, 2011) (**Figure 1.12**).

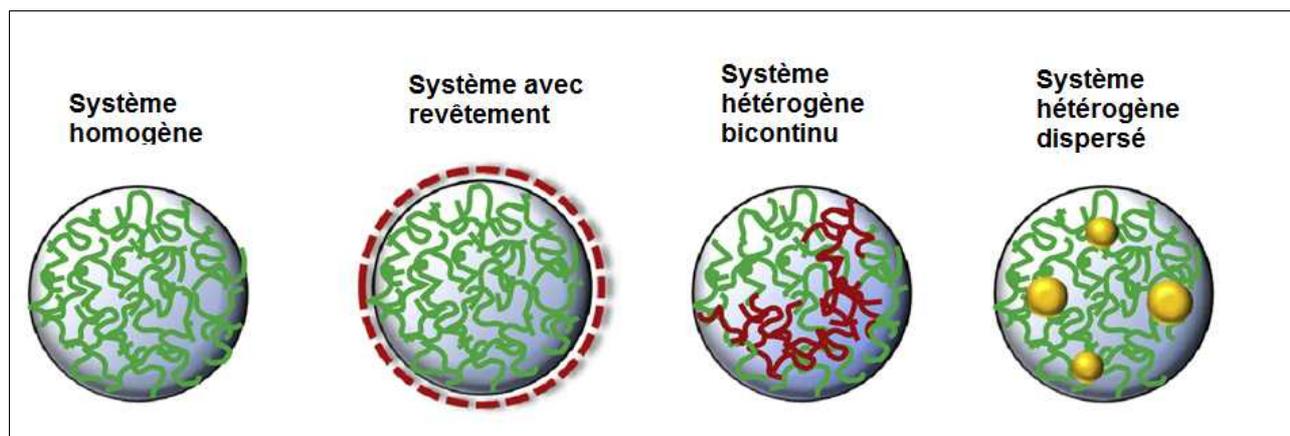


Figure 1.12 Exemple de structures pouvant être formées par des systèmes bipolymériques (d'après Matalanis *et al.*, 2011).

Système homogène : particule constituée d'un ou plusieurs biopolymères qui sont « intimement » mélangés et apparaissent formant un système homogène à l'échelle de la particule

Système avec revêtement : particule composée de deux phases, l'une formant un revêtement autour de l'autre. Ce revêtement peut varier en terme de composition, d'épaisseur et de structure, il peut être simple ou multi-couches.

Système hétérogène bicontinu : intérieur de la particule constitué de deux biopolymères au moins qui sont séparés en deux phases de compositions différentes (par exemple, une phase riche en protéine et l'autre riche en polysaccharide)

Système hétérogène dispersé : intérieur de la particule constitué de deux biopolymères dont un est dispersé dans la phase riche en l'autre.

Une fois qu'une microstructure particulière est obtenue (sphères, fibres, gouttelettes allongées (larmes)), il est parfois possible de figer le système dans un état cinétiquement stable en changeant par exemple les conditions environnementales pour qu'une phase ou les deux forment un gel. Les modes opératoires pour former de tels systèmes sont multiples : technique de moulage, pulvérisation (« spray drying »), méthode d'injection (extrusion) ((micro)billes d'alginate), méthode microfluidique (Matalanis *et al.*, 2011 ; McClements 2012).

Quatre principaux mécanismes ont été identifiés pour caractériser les propriétés de libération de tels systèmes : diffusion, érosion, fragmentation, gonflement/contraction (Jones et McClements, 2010 ; Matalanis *et al.*, 2011).

Peu de travaux ont été publiés sur l'incorporation de cellules bactériennes dans de tels systèmes à deux biopolymères dans des conditions d'incompatibilité thermodynamique. Tout d'abord, ces propriétés d'interaction ont été exploitées par les biologistes pour effectuer des séparations de matériel biologique (cellules animales, végétales ou microorganismes) dans des conditions douces (Pacek *et al.*, 2000) ou pour caractériser les propriétés physico-chimiques de surface de cellules bactériennes (point isoélectrique, charge globale, hydrophobicité locale)

(Umakoshi *et al.*, 1997). Cette méthode connue sous le nom d'ATPS (« Aqueous Two-Phase System ») repose sur le partage des cellules entre deux phases pouvant être issues d'une incompatibilité thermodynamique entre deux polymères de nature différente (exemple Poly-Ethylène Glycol (PEG) / Dextran (Umakoshi *et al.*, 1997)). Cette technique a par exemple été utilisée pour effectuer la séparation des cellules de leurs métabolismes à partir des milieux de culture (**Tableau 1.10**).

Tableau 1.10 Incorporation de microorganismes dans des systèmes incompatibles.

<i>Système incompatible</i>	<i>Microorganisme</i>	<i>Application</i>	<i>Référence</i>
PEG / dextran PEG / HPS EO / HPS PO / HPS	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> 9649 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 19435, 65.1 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> DSG-HB	Extraction de l'acide lactique	Planas <i>et al.</i> , 1996
PEG / dextran	<i>Escherichia coli</i> W3110, ML308 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface de cellules bactériennes	Umakoshi <i>et al.</i> , 1997
PEG / dextran	<i>Polyporus squamosus</i>	Extraction de la pectinase	Antov et Pericin, 2000 Antov <i>et al.</i> , 2001
PEG / phosphate PEG / sulfate PEG / dextran	<i>Trichoderma harzianum</i>	Extraction de composés aromatiques	Rito-Palomares <i>et al.</i> , 2000 Rito-Palomares <i>et al.</i> , 2001
Sodium polystyrène sulfate / phosphate Succinoglycan / phosphate	<i>Escherichia coli</i> AB1157 <i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm1021	Compréhension du phénomène de formation de biofilms	Schwarz-Linek <i>et al.</i> , 2010

EO : oxyde d'éthylène

HPS : amidon hydropropyle (« Hydropropyl Starch »)

PEG : Poly-Ethylène Glycol

PO : oxyde de propylène

Depuis ces dernières années, des systèmes incompatibles sont utilisés dans le domaine des probiotiques pour réaliser des microencapsulations de souches actives (**Tableau 1.11**).

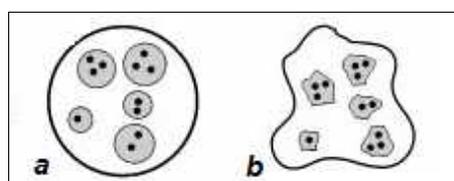
Tableau 1.11 Microencapsulation de souches probiotiques confinées dans des systèmes incompatibles.

<i>Système incompatible</i>	<i>Microorganisme</i>	<i>Méthode d'encapsulation</i>	<i>Référence</i>
PVP / dextran	<i>Enterococcus faecium</i> M74	Pulvérisation-séchage	Millqvist-Fureby <i>et al.</i> , 2000
PEG / dextran PVP / dextran	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	Pulvérisation-séchage	Leja <i>et al.</i> , 2009
Alginate / isolat de protéine de soja	<i>Lactobacillus casei</i>	Technique de l'émulsion	Andrade <i>et al.</i> , 2010
Alginate / isolat de protéine de pois			

PEG : PEG : Poly-Ethylène Glycol

PVP : Poly (Vinyl Pyrrolidone)

En effet, les cultures probiotiques sont généralement utilisées sous forme sèche pour une incorporation dans des produits laitiers ou pour une prise sous forme de complément alimentaire (Leja *et al.*, 2009). Les bactéries probiotiques ont un pourcentage de survie et d'activité résiduelle moindre lorsqu'elles ont été exposées à des conditions de pression osmotique et de température extrêmes pendant l'étape de séchage (Leja *et al.*, 2009). Les systèmes APTS sont alors utilisés comme facteur de protection. Si les cellules sont confinées dans la phase dispersée qui est elle-même entourée de la phase continue, il y a donc une double protection illustrée (Leja *et al.*, 2009) par la **Figure 1.13** ci-dessous (Millqvist-Fureby *et al.*, 2000).

**Figure 1.13** Représentation schématique de particule obtenue après pulvérisation-séchage d'un système incompatible confinant du matériel biologique (d'après Millqvist-Fureby *et al.*, 2000).

a : Gouttelette après pulvérisation.

b : Particule sèche.

Les parties grises et blanches représentent les deux phases du système, chacune enrichie en un polymère. Les points noirs représentent le matériel encapsulé confiné dans la phase dispersée du système.

En plus de cette notion de double protection, Nag *et al.*, en 2011, ont mis en avant des améliorations dans les propriétés physico-chimiques et mécaniques du gel formé avec un mélange de deux biopolymères caséinates de sodium / gomme gellane en comparaison d'un gel formé uniquement avec des caséinates de sodium. Même si les conditions de concentration ne permettent pas de classer ce mélange dans les systèmes APTS, ces travaux mettent en avant un autre point positif pour

l'utilisation de mélange de biopolymères. La gomme gellane (produit par *Pseudomonas elodea*) est connue pour fournir des petites particules en suspension sans provoquer une augmentation de la viscosité significative. De plus, elle n'est pas facilement dégradée par les enzymes et résiste à des environnements acides (Nag *et al.*, 2011). La combinaison des caséinates de sodium et de la gomme gellane augmente alors la force du gel et sa résistance (Nag *et al.*, 2011).

Pour l'utilisation de tels systèmes polymériques incompatibles pour confiner du matériel biologique comme des cellules, il est important de s'intéresser aux interactions mises en jeu dans les systèmes entre les polymères et le matériel confiné. Dans le cas de cellules bactériennes, ces interactions guideront leur localisation.

1.2.4 Mécanismes physico-chimiques généraux mis en jeu dans l'adhésion bactérienne à une surface : application aux LAB

1.2.4.1 Relation entre propriétés de surface et interactions

Les microorganismes peuvent adhérer aux surfaces. Le rôle de l'environnement (paramètres physico-chimiques, conditions hydrodynamiques) est un paramètre essentiel de l'interaction entre le microorganisme et une surface. Mais d'autres facteurs liés au support et au microorganisme influencent ces interactions (**Tableau 1.12**) (An *et al.*, 1997 ; Palmer *et al.*, 2007).

Tableau 1.12 Principaux paramètres influençant les interactions des microorganismes avec leur environnement.

<i>Facteurs liés à la surface-support</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Nature chimique de la surface - Rugosité et micro-topographie - Charge de surface - Hydrophobicité
<i>Facteurs liés au microorganisme</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Concentration cellulaire - Espèce - Composition et structure de la surface cellulaire - Caractéristiques physico-chimiques de la surface microbienne (hydrophobicité, charge) - Etat physiologique (phase de croissance) - Adaptation phénotypique
<i>Facteurs liés à l'environnement</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Température - Force ionique et nature des sels - pH - Présence de surfactants, de macromolécules, d'éléments nutritifs - Conditions hydrodynamiques

Dans les approches physico-chimiques classiques, les bactéries sont assimilées à des particules colloïdales idéales, sphériques et rigides, avec une surface parfaitement définie et uniforme. Elles portent à leur surface un grand nombre de macromolécules comme des protéines, des peptidoglycanes, des polysaccharides et des molécules d'acide teichoïque. Tous ces composés apportent aux cellules leurs propriétés physico-chimiques de surface qui permettent aux bactéries d'interagir avec d'autres entités par des interactions de type acide/base (au sens de Lewis), électrostatiques ou encore hydrophobes (Ly *et al.*, 2008a). Les propriétés de surface liées aux interactions entre bactéries et interfaces ont été largement étudiées pour la formation de biofilm. Ces informations sont essentielles dans de nombreux domaines : biomédical, sécurité alimentaire, corrosion et environnement. Ce sont ces propriétés de surface qui déterminent principalement les interactions qu'ont les microorganismes avec leur environnement (Schär-Zammaretti et Ubbink, 2003). Rosenberg *et al.*, en 1980, rapportaient déjà que la nature hydrophobe de la surface externe d'une grande variété de microorganismes est impliquée dans leur répartition dans des systèmes liquide/liquide aux interfaces ou dans une phase particulière. Bien sûr, le poids relatif de ces caractéristiques biologiques métaboliques, physiques et chimiques dépend de la souche microbienne étudiée.

Quelques études ont été réalisées ces dernières années dans le domaine alimentaire. Certains auteurs (Kiely et Olson, 2000) ont étudié les propriétés de surface de bactéries lactiques dans le but de comprendre leur localisation dans des produits fermentés. Ly *et al.* ont publié une série de travaux sur les interactions entre bactéries lactiques et :

- composants alimentaires : composés d'arômes et matières grasses du lait (2006b) ;
- émulsions modèles (2006a) ;
- composés d'arômes (2008b) ;
- protéines laitières (2008a).

Ly *et al.* (2008b) ont travaillé avec deux souches de *Lactococcus lactis* LLD16 et LLD18 ayant des propriétés de surface différentes. Dans des émulsions huile dans eau avec trois protéines laitières différentes, ils ont montré l'importance que ces propriétés de surface pouvaient avoir dans la structuration des systèmes. Les cellules bactériennes interagissent avec les autres composants du système et influencent la stabilité des émulsions. Par exemple, si des bactéries chargées négativement sont ajoutées à des émulsions avec des gouttelettes chargées positivement, les cellules peuvent s'absorber sur les gouttelettes par des interactions électrostatiques. De plus, différents effets

ont été observés pour la souche LLD16 et pour la souche LLD18. Ceci montre l'importance de s'intéresser aux propriétés de surface des bactéries comme le point isoélectrique et le caractère hydrophobe/hydrophile.

1.2.4.2 Caractérisation des propriétés de surface des LAB

L'hydrophobicité et la charge de la surface cellulaire jouent des rôles prépondérants dans les interactions entre cellules et surface. Ces deux propriétés sont liées à la composition de la paroi cellulaire (Palmer *et al.*, 2007) ainsi qu'aux conditions de culture et l'âge de la culture. L'hydrophobicité est fréquemment déterminée par la méthode MATS (« Microbial Adhesion To Solvents ») (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996) et la charge de surface des cellules est déterminée par la mesure de la mobilité électrophorétique.

1.2.4.2.1 MATS (« Microbial Adhesion To Solvents »)

Cette méthode a été mise au point par Bellon-Fontaine *et al.* en 1996. Elle consiste en la caractérisation de la surface cellulaire des microorganismes en déterminant le caractère électron-donneur/électron-accepteur (acide/base au sens de Lewis) et le caractère hydrophile/hydrophobe. Cette méthode repose sur l'affinité des microorganismes pour différents solvants de propriétés physico-chimiques connues. Différents solvants ont été utilisés (Tableau 1.13) : un solvant monopolaire acide, le chloroforme ; un solvant monopolaire basique, l'éther ; et deux solvants apolaires, l'hexane et l'hexadécane.

Tableau 1.13 Caractéristiques énergétiques ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$) des solvants utilisés pour la méthode MATS selon Bellon-Fontaine *et al.*, 1996 avec γ_L^{LW} composante de Lifshitz Van Der Waals, γ_L^+ composante électron-accepteur et γ_L^- composante électron-donneur.

Nom du solvant	γ_L^{LW}	γ_L^+	γ_L^-	Caractère acide ou basique
hexadécane	27,7	0	0	-
chloroforme	27,2	3,8	0	acide
hexane	18,4	0	0	-
éther	16,7	0	16,4	basique

Ainsi, la différence d'affinité entre le chloroforme (solvant monopolaire acide) et l'hexadécane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère électron-donneur (caractère de base de Lewis) d'une souche bactérienne, puisque les composants de Van Der Waals des solvants sont identiques.

De même, la différence d'affinité entre l'éther et l'hexane (solvants apolaires) nous renseigne sur le caractère électron-accepteur (caractère acide de Lewis) de cette même souche bactérienne, les composantes de Van Der Waals de ces deux solvants étant similaires.

L'estimation des caractères électron-donneur et électron-accepteur ainsi que l'affinité pour les solvants apolaires nous permettent d'en déduire le caractère hydrophile/hydrophobe de la souche étudiée. Afin de s'affranchir des interactions électrostatiques entre microorganismes et solvants, les cellules sont placées dans un liquide de force ionique élevée, tel que le tampon phosphate de sodium.

Giaouris *et al.*, en 2009, ont testé 50 souches de *Lactococcus lactis* pour leurs propriétés de surface en utilisant la méthode MATS (solvants utilisés : chloroforme et hexadécane). Ces auteurs ont révélé une grande variation entre les souches vis-à-vis du pourcentage d'adhésion à l'hexadécane. La diversité de ces propriétés est expliquée par une possible connexion avec l'origine de la souche (origine animale, végétale, humaine). Néanmoins, la plupart des souches testées présentent une surface avec un clair caractère hydrophile (pourcentage d'affinité avec l'hexadécane inférieure à 40 %). De plus, une grande partie de ce pool de 50 souches est électron donneuse. Cette propriété de basicité selon Van der Waals a été également mise en évidence par Ly *et al.* (2006b) pour 20 souches de *Lactococcus* avec une surface hydrophile.

Giaouris *et al.* (2009) rapportent des travaux qui montrent que la surface hydrophile de ces souches possède une concentration en polysaccharides deux fois plus importante qu'en protéines. De plus, l'hydrophobicité de surface des cellules est aussi corrélée à la concentration en azote ou en carbone, et est inversement proportionnelle à la concentration en oxygène dans la paroi cellulaire externe.

1.2.4.2.2 Mobilité électrophorétique, mesure du potentiel Zêta

La mesure du potentiel Zêta permet de déterminer les caractéristiques des charges électriques qu'une particule acquiert en solution avec les ions qui l'entourent. Le potentiel Zêta est déterminé par la mesure de la direction et la vitesse des particules dans un champs électrique.

Le point isoélectrique (pI) des LAB est généralement compris entre 2 et 4 (**Tableau 1.14**). Aux $\text{pH} > \text{pI}$, le potentiel zêta est négatif (charge globalement négative) et inversement aux $\text{pH} < \text{pI}$ (charge globalement positive).

Tableau 1.14 Valeurs de quelques pI de LAB.

<i>Souches</i>	<i>pI</i>	<i>Références</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC12046	3,0	Boonaert et Rouxhet, 2000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> diacetylactis LMG 9452	2,0	
<i>Lactobacillus</i>		Schär-Zammaretti et Ubbink, 2003
<i>johnsonii</i> DSM20533	3,7	
<i>johnsonii</i> ATCC332	< 3	
<i>johnsonii</i> ATCC33200	4,1	
<i>crispatus</i> DSM20584	4,9	
<i>helveticus</i> ATCC12046	3,9	
<i>helveticus</i> ATCC15009	3,7	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biov. <i>diacetylactis</i>		Ly <i>et al.</i> , 2006a, 2008a
LLD16	< 2	
LLD18	3,5	
LLD125	2,5	

Boonaert et Rouxhet (2000) ont comparé les propriétés des cellules collectées en phase exponentielle et en phase stationnaire. Pour les souches testées, ils n'ont pas obtenu de différence. Toujours d'après leurs travaux, ces propriétés électrostatiques sont à corrélérer avec la composition cellulaire. La surface de leurs souches est composée majoritairement de polysaccharides. Le caractère de la charge fortement négative à pH élevé serait dû à un ratio N(azote)/P(phosphate) faible reflétant l'exposition relative des protéines et des groupements phosphate à la surface des cellules.

1.2.5 Localisation des cellules : outils de microscopie

Pour observer la répartition des cellules bactériennes dans les systèmes de confinement, la microscopie est l'outil le plus utilisé. Les systèmes biologiques sont généralement tridimensionnels : les systèmes polymériques biphasiques envisagés dans cette étude en font partie. Avec un microscope conventionnel, la lumière de toutes les zones de l'objet, pas seulement de la zone de mise au point, entre dans le microscope et est utilisée pour créer une image brouillée et confuse. Grâce au développement du Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL), ce problème a été résolu. Le microscope confocal permet une meilleure résolution axiale grâce à la présence d'un trou de filtrage (pinhole, diaphragme) adapté qui permet d'éliminer la lumière émise par les plans sous- et sur-jacents au plan de focalisation. Son utilisation est souvent couplée à l'emploi de fluorochromes.

1.2.5.1 Systèmes polymériques biphasiques et microscopie confocale

Les chercheurs spécialistes des mélanges d'hydrocolloïdes utilisent généralement la microscopie confocale pour déterminer le comportement de déphasage d'un mélange. Pour différencier la phase protéique de la phase polysidique, la protéine est le plus souvent marquée avec la Rhodamine B IsoThioCyanate (RITC) (Alves *et al.*, 2001 ; Butler et Heppenstall-Butler, 2003 ; Nono *et al.*, 2011 ; Mession *et al.*, 2012 ; Perrechil et Cunha, 2012). La RITC est connue pour se lier aux protéines par des liaisons hydrophobes. Des faibles quantités de l'ordre de 10 ppm suffisent (Mession *et al.*, 2012).

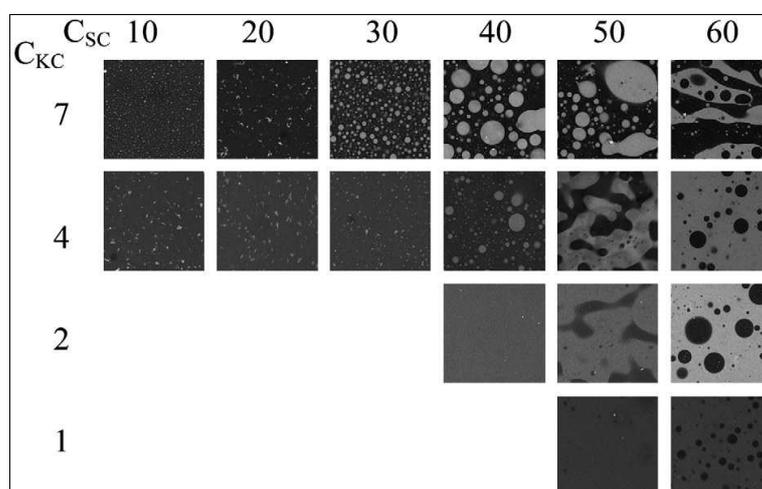


Figure 1.14 Images de microscopie confocale de mélanges caséinate de sodium (SC) / κ -carraghénane (KC) dans NaCl à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (Nono *et al.*, 2011).

La concentration de chaque polymère est indiquée en g.L^{-1} . Les échantillons ont été mélangés et chauffés 5 min à 60°C puis observés immédiatement à 20°C . Les zones claires sont les zones riches en protéines. Le format des images est de $160 \times 160 \mu\text{m}$.

1.2.5.2 Les fluorochromes pour marquer les cellules bactériennes

Différents fluorochromes sont généralement utilisés comme marqueurs pour l'observation par microscopie de fluorescence des microorganismes. Pour marquer les acides nucléiques et étudier l'intégrité cellulaire, les principaux cités sont : l'iodure de propidium (IP), le DAPI (4', 6'-diamino-2-phénylindole), l'acridine orange et le Syto 9. Leurs caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 1.15** (Breeuwer et Abee, 2000 ; Joux et Lebaron, 2000). Certaines colorations permettent de détecter la totalité de la population, d'autres uniquement les cellules mortes et d'autres uniquement les cellules vivantes.

Tableau 1.15 Caractéristiques des fluorochromes les plus couramment utilisés pour marquer les acides nucléiques et étudier l'intégrité cellulaire.

Fluorochromes	λ d'excitation (nm)	λ d'émission (nm)	Cible	Mode d'action
Iodure de propidium	535	617	ADN	-Pénètre les cellules ayant une membrane endommagée : fixation aux acides nucléiques -Fluorescence rouge
DAPI (4', 6'-diamino-2-phénylindole)	345	455	ADN/ARN	-S'intercale entre les bases A, T, U en émettant une fluorescence bleue
Acridine orange	503	530/640	ADN/ARN	-Si le rapport ARN/ADN est élevé, les bactéries sont actives → coloration rouge ou orange -Si le rapport ARN/ADN est faible, les bactéries sont mortes → coloration verte
Syto 9	504	523	ADN	-Pénètre dans les cellules quelque soit leur état physiologique et se fixe aux acides nucléiques -Fluorescence verte des cellules

Depuis une dizaine d'années, le kit Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes, Oregon, États-Unis) est de plus en plus utilisé en recherche dans divers domaines et notamment l'analyse de la viabilité de microorganismes encapsulés (Pereira *et al.*, 2005 ; Wadhawan *et al.*, 2011). La coloration avec le kit Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit peut être utilisée pour simplement localiser les cellules mais elle permet également d'estimer la population de bactéries viables et de bactéries totales d'un échantillon.

Ce kit est composé de deux fluorochromes cités précédemment : le Syto 9 et l'iodure de propidium (IP). Ce sont des marqueurs des acides nucléiques mais ils diffèrent par leurs caractéristiques spectrales et leur capacité à pénétrer dans les cellules. Le Syto 9 est un fluorochrome perméant qui est capable de pénétrer toutes les cellules quel que soit leur état physiologique puis de se fixer aux acides nucléiques et de colorer les cellules en vert. Ainsi, ce fluorochrome peut être utilisé pour le marquage et le dénombrement de la totalité des cellules présentes dans un échantillon donné. L'IP est utilisé comme contre colorant du Syto 9 permettant de distinguer les cellules mortes des cellules viables. Il est non perméant du fait de la taille et de la charge de la molécule de propidium et pénètre exclusivement les bactéries dont la membrane cytoplasmique est endommagée pour se fixer aux acides nucléiques et colorer ainsi les cellules en rouge.

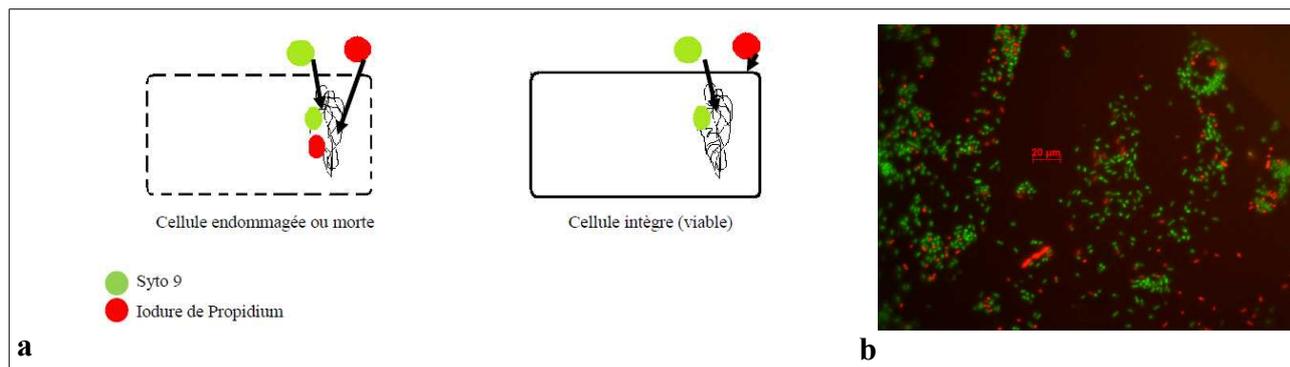


Figure 1.15 a. Mode de fonctionnement des deux fluorochromes du kit Live/Dead® BacLight™
b. Viabilité d'une culture de *Lactococcus lactis* LAB3 (starter commercial MD089, Ezal line, Rhône Poulenc, Dangé Saint-Romain, France) dans MRS en anaérobiose à 24 h en utilisant le kit Live/Dead® BacLight™, objectif 100, microscope à épifluorescence Axiovert25 (Zeiss).

L'intensité de la fluorescence obtenue avec ces deux fluorochromes est grande, avec un contraste important entre les cellules vertes et les cellules rouges, et une fluorescence de fond minimale (Boulos *et al.*, 1999).

Dans la littérature, le kit Live/Dead® BacLight™ a été utilisé dans les deux cas auxquels nous nous sommes intéressés dans cette étude : **(i)** mélanges dispersés (type émulsion) et **(ii)** gels d'immobilisation des cellules.

(i) Pour ce premier cas, les travaux exposés dans la littérature sont le plus souvent en rapport avec les matrices alimentaires. Par exemple, Auty *et al.*, 2001, ont incorporé des souches probiotiques dans du lait écrémé et du fromage de type Cheddar. Même dans ces milieux complexes, le marquage semble fonctionner (**Figure 1.16.a**).

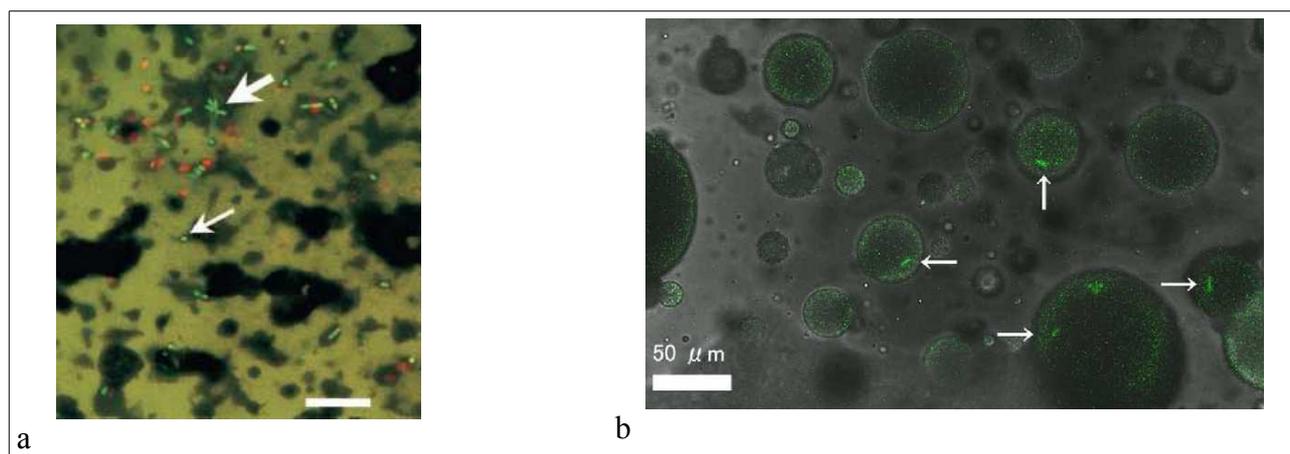


Figure 1.16 Exemples de marquage cellulaire par le kit Live/Dead® BacLight™ dans des systèmes dispersés complexes (d'après Auty *et al.*, 2001; Shima *et al.*, 2006)

a. Observation de la souche probiotique *Bifidobacterium* sp. UCC 35612 marquée avec le kit Live/Dead® BacLight™ dans du fromage type Cheddar (échelle 25 µm) (Auty *et al.*, 2001).

Les cellules sont observées dans la phase protéique verte claire. Les espaces noirs représentent les matières grasses.

b. Cellules de *Lactobacillus acidophilus* JCM1132 (souche probiotique) incorporées dans une émulsion eau dans huile dans eau pour un effet de protection. Cette photographie est composée de l'image optique et de l'image avec le filtre de fluorescence du Syto 9 uniquement (Shima *et al.*, 2006).

Les flèches pointent les cellules contenues dans les gouttelettes d'huile.

(ii) L'immobilisation de cellules est largement utilisée dans la plupart des applications en biotechnologies et là encore, le kit Live/Dead® BacLight™ a été mis en œuvre. Wadhawan *et al.*, 2011, l'ont utilisé pour déterminer l'effet de leurs procédures d'encapsulation (dans l'alginate de calcium et dans du PVA phosphorylé (« PolyVinyl Alcohol »)) sur la viabilité des cellules (*Escherichia coli* K-12 JM019 et *Agrobacterium radiobacter* J14a). Le pourcentage de cellules viables dans la culture était compris entre 54 et 74 % avant immobilisation et entre 39 et 62 % après immobilisation. Pereira *et al.*, 2005, se sont, quant à eux, intéressés au suivi de la viabilité et de la morphologie des cellules (*Escherichia coli* XL1-blue, *Streptomyces nodosus* ATCC 14899) au cours du temps (sur plusieurs dizaines de jours) une fois encapsulées dans l'alginate de calcium. En plus des données récoltées sur la viabilité, l'analyse des images prises des sections des billes (de 10 µm) a montré une répartition uniforme des cellules d'*E. coli* dans les billes.

1.3 Physico-chimie des systèmes polymériques biphasiques

Les structures à base de mélanges de biopolymères (abordées au paragraphe 1.2.3) se révèlent être des systèmes d'intérêts et en développement récent pour servir de support à des molécules biologiques (actifs thérapeutiques, arômes, bactéries, ...) pour leur transport et leur libération ciblée. Dans ce paragraphe, les comportements de systèmes bipolymériques en général et celui du système alginate/caséinate en particulier (qui est le système choisi pour cette étude) vont donc être détaillés.

1.3.1 Les mélanges de biopolymères

1.3.1.1 *Comportements de phase des systèmes protéine/polyoside/eau*

Les aspects thermodynamiques qui déterminent le comportement des mélanges de biopolymères en milieu aqueux sont les mêmes que ceux des mélanges de polymères synthétiques en milieu solvant (De Kruif et Tuinier, 2001).

Lorsque deux biopolymères (P1, P2) en solution sont mélangés, par exemple une protéine et un polyoside, les différents comportements décrits précédemment sur la **Figure 1.11** (paragraphe 1.2.3) sont observables :

- miscibilité ;
- séparation de phase associative : complexes solubles ou insolubles (coarcevation) ;
- séparation de phase ségrégative : co-solubilité ($C < C_{\text{seuil}}$), incompatibilité ($C > C_{\text{seuil}}$).

Dans le cas de solutions très diluées, le système est stable et les deux biopolymères sont miscibles. Lorsque les concentrations augmentent, les systèmes deviennent plus instables en fonction des interactions. La formation de ces systèmes est due aux caractéristiques structurales des polymères (poids moléculaire, présence de groupements hydrophobes, charge des polymères), au pH, à la température, à la force ionique de la solution et à la concentration des polymères (Lemay, 2000).

Néanmoins, dans un grand nombre de cas, les mélanges de biopolymères tendent à se séparer (Tolstoguzov, 1991 ; Grinberg et Tolstoguzov, 1997). Quand la force motrice de la séparation de phase est répulsive, le système qui en résulte est appelé système thermodynamiquement incompatible (Jones et McClements, 2010). Dans la revue de Grinberg et Tolstoguzov, 1997, une centaine de mélanges protéines (gélatine, caséine, sérum d'albumine bovin)/polyosides (neutres (dextran, amylopectine), anioniques (alginate, gomme arabique, pectine)) est présentée et la

majorité est décrite comme incompatible thermodynamiquement.

Les molécules de biopolymères interagissent entre elles (P1-P1, P2-P2 ou P1-P2) par une grande diversité de liaisons physiques et/ou chimiques. Ces forces sont modulées par les conditions environnementales et la composition de la solution (pH, force ionique, température, solvant). Les forces d'interaction entre deux polymères incluent les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les effets d'exclusion de volume (déplétion) (Jones et McClements, 2010).

Dans le cadre de notre étude, des mélanges de compositions induisant une séparation de phase ont été utilisés. La séparation de phase ségrégative était auparavant un moyen de concentrer des solutions de protéine et obtenir ainsi des concentrations qui n'auraient pas pu être atteintes avec une solution protéique seule (Tolstuguzov, 1995). De tels systèmes ont par ailleurs un intérêt dans la formation de microstructures particulières. Un système biphasique peut être cisailé ou extrudé pour former un système comportant une phase aqueuse dispersée sous forme de particules sphériques dans une seconde phase aqueuse. Ce type de système est appelé une émulsion eau dans eau (Jones et McClements, 2010). Par la suite, la phase continue peut être gélifiée en utilisant des ions calcium par exemple pour des phases riches en alginate ou en pectine (Jones et McClements, 2010).

1.3.1.2 Séparation de phase

1.3.1.2.1 Aspect thermodynamique

Selon le second principe de la thermodynamique, des espèces à mélanger sont miscibles si l'énergie libre de mélange (ΔG) est minimale :

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

avec ΔH , l'enthalpie ; ΔS , l'entropie ; T , la température.

Dans le cas d'une solution idéale, les forces intermoléculaires (responsables du terme enthalpique « ΔH ») sont négligées devant la contribution entropique (responsable du terme « $-T \Delta S$ »).

Flory (1942) et Huggins (1942) ont été les premiers à établir un modèle adapté aux solutions de polymères. Cette théorie ne peut pas décrire les propriétés thermodynamiques des solutions mais permet néanmoins de prédire la stabilité d'une solution de macromolécules par rapport à celle observée dans une solution de molécules simples. Ils ont ajouté à l'expression de ΔG un terme enthalpique pour exprimer l'écart à l'idéalité. Il est décrit par le paramètre sans dimension de Flory-Huggins (χ_{SP1}) qui reflète les interactions entre le solvant S et le polymère $P1$. Lorsque $\chi_{SP1} < 0,5$,

le système est miscible ; $\chi_{SP1} > 0,5$, une séparation a lieu (Donato, 2004).

Pour un mélange de deux polymères, l'affinité entre polymères est aussi prise en compte sous la même forme : χ_{P1P2} . Selon ces paramètres, le comportement du mélange est déterminé (Doublier *et al.*, 2000) :

- si $\chi_{P1P2} < 0$, la séparation de phase est de type associatif, les interactions entre P1 et P2 sont plus enthalpiquement favorables que P1 ou P2 avec le solvant S ;
- si $\chi_{P1P2} > 0$, la séparation de phase est ségrégative, les interactions entre P1 et S et P2 et S sont prédominantes.

Ce modèle peut convenir à des mélanges aqueux protéine/polyoside lorsque la protéine a certaines caractéristiques comme par exemple la gélatine qui est fibrillaire, de conformation en chaînes allongées (Clark *et al.*, 1999). Pour d'autres types de mélanges avec des protéines globulaires sphériques, ayant une forme compacte, il est plus difficile de conclure (Doublier *et al.*, 2000).

Edmond et Ogston (1968) ont développé un autre modèle basé sur le développement du viriel¹ en utilisant ses coefficients du second ordre. Les seconds coefficients du viriel relatifs au polyoside (A_{ps}) et à la protéine (A_{pr}) reflètent les interactions entre biopolymères et solvant. Sur le même principe que celui de la théorie de Flory-Huggins, à partir du second viriel croisé pour le mélange protéine/polyoside (A_{pr-ps}), il est possible d'estimer si le système est compatible ou incompatible. La séparation de phase se produit lorsque :

$$(A_{pr-ps})^2 > A_{pr-pr} * A_{ps-ps}$$

avec A_{pr-ps} , A_{pr-pr} et A_{ps-ps} les coefficients du viriel d'interaction protéine/polyoside, protéine/protéine et protéine/polyoside, respectivement (Grinberg et Tolstoguzov, 1997).

Ces variations peuvent être interprétées de la même façon que le paramètre de Flory-Huggins (χ_{ps-pr}) caractérisant les interactions en protéine et polyoside. Une valeur positive de A_{pr-ps} traduit une séparation de phase ségrégative entre biopolymères alors qu'une valeur négative traduit la formation d'un complexe (Grinberg et Tolstoguzov, 1997).

1.3.1.2.2 Phénomène de déplétion

Ce mécanisme de nature entropique résulte d'interactions non-spécifiques menant à une séparation de phase pour un mélange neutre de polymères idéaux non adsorbants ajouté à une suspension de particules sphériques colloïdales. Celui-ci a été présenté pour la première fois par

¹ Le théorème du viriel est une relation générale de mécanique classique qui s'applique à un système de plusieurs corps en interaction (Infelta et Graetzel, 2006).

Asakura et Oosawa (1954) qui ont montré que deux plaques parallèles s'attirent quand elles sont immergées dans une solution polymérique ne contenant pas de polymère adsorbant. Plus tard, Vrij (1976) a développé une idée similaire pour l'interaction de deux particules sphériques colloïdales dans une solution polymérique (**Figure 1.17**). Dans le cas où les particules sphériques colloïdales (sphères) et le polymère n'ont pas d'autres interactions spécifiques, les molécules de polymères sont exclues de la surface des sphères. Il en résulte une couche de déplétion (d'épaisseur Δ) où la pression osmotique Π_1 est plus faible que celle dans le volume restant Π_2 . Si deux sphères se rencontrent du fait du mouvement brownien, leur couches de déplétion se superposent sur une partie. Le volume disponible pour le polymère augmente alors du volume de chevauchement (V_c), volume couvert par les deux couches de déplétion. Cette augmentation du volume disponible pour le polymère est associée à une baisse de l'énergie libre de $\Delta G = - \Pi * V_c$. La séparation de phase (en une phase riche en sphères et une phase riche en polymère) est donc avantageuse d'un point de vue entropique. L'exclusion des chaînes du polymère initialement dans l'espace compris entre les particules n'a lieu que lorsque la distance centre à centre entre les deux particules est inférieure à la somme des diamètres $\sigma_c + \sigma_p$, avec σ_p le diamètre de giration du polymère et σ_c , celui des particules sphériques colloïdales.

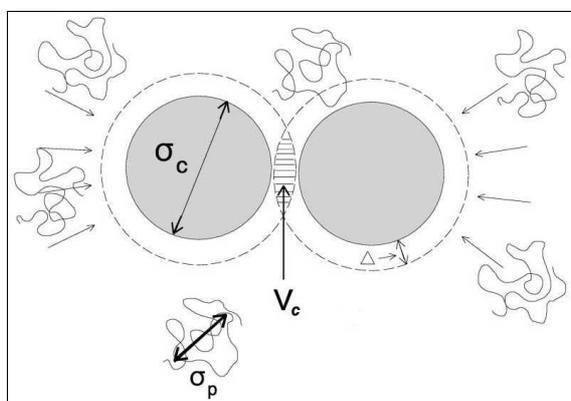


Figure 1.17 Représentation schématique de l'interaction de déplétion entre deux particules (de diamètre σ_c) de protéine globulaire immergées dans une solution de polymère (diamètre σ_p) (d'après De Kruif et Tuinier, 2001).

$2 * \Delta$ (épaisseur de la couche de déplétion) = σ_p

V_c = volume de chevauchement

Ce dernier phénomène peut donc jouer un rôle, en s'additionnant à l'incompatibilité thermodynamique, dans la séparation d'un mélange bipolymérique contenant une protéine globulaire. Doublier *et al.*, en 2000, font référence à plusieurs études qui ont montré le rôle du

mécanisme de déplétion/floculation dans la séparation ségrégative d'un système micelles de caséine/polyoside. De plus, ce phénomène pourrait aussi avoir de l'importance dans la localisation de particules comme des cellules bactériennes dans des systèmes bipolymériques (un des objectifs de notre étude) (Schwarz-Linek *et al.*, 2010).

1.3.1.2.3 Diagramme de phases

Dans le cas des systèmes ségrégatifs, les mélanges de polymères peuvent être décrits à l'équilibre thermodynamique par leur diagramme de phases (Tolstoguzov, 1991).

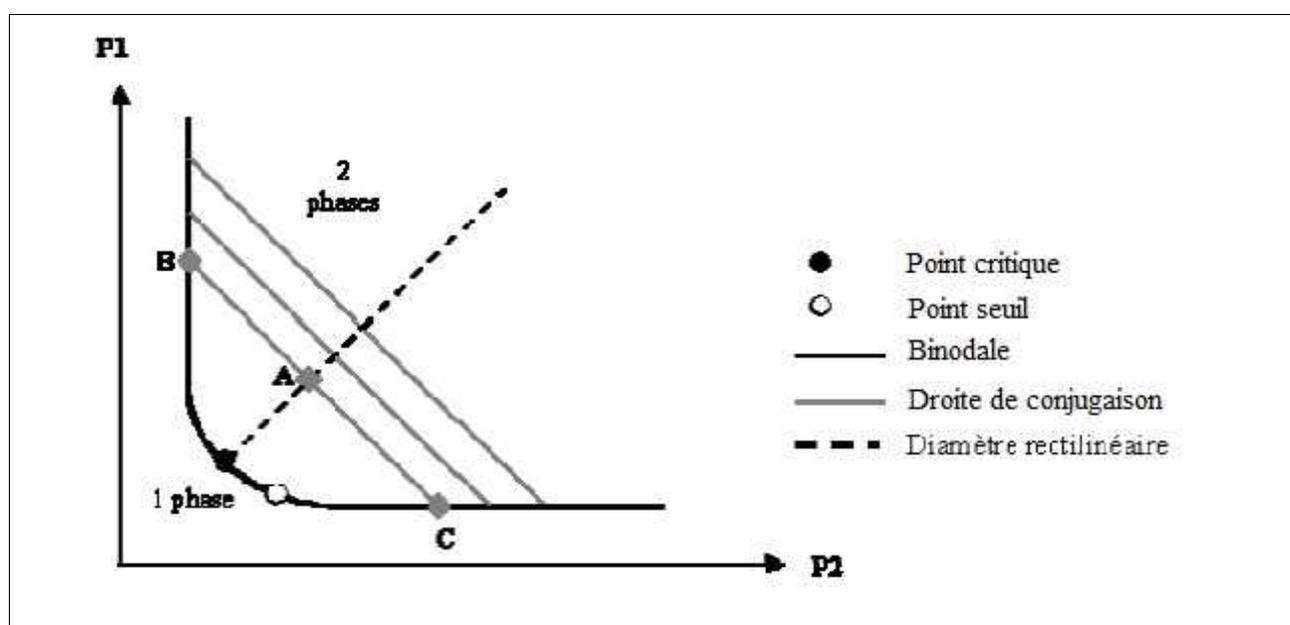


Figure 1.18 Représentation schématisée d'un diagramme de phases d'un mélange ségréгатif d'un polymère P1 et d'un polymère P2 (Donato, 2004).

Le diagramme de phases permet de connaître le nombre de phases présentes pour une composition particulière, les volumes relatifs de chacune des phases et la composition en biopolymères de chacune des phases. La limite entre le domaine à une phase et le domaine à deux phases est donnée par la binodale. Au-dessous de la binodale, le système comporte une phase et au-dessus de la binodale, il en comporte deux (par exemple, la composition du point A sur la **Figure 1.18** donne un système biphasique). Dans le cas d'un système biphasique, les compositions des phases qui en résultent (points B et C) sont situées aux intersections de la binodale et d'une droite qui passe par le point A, la droite de conjugaison. Les mélanges situés sur une même droite de conjugaison conduisent à des phases de mêmes compositions. Seuls les volumes des phases varient : le rapport

AB/AC correspond au rapport des volumes des phases. Le diamètre rectilinéaire joint les milieux des droites de conjugaison (qui représentent les mélanges se séparant en deux phases de même volume). Le point critique est l'intersection entre le diamètre rectilinéaire et la binodale et donne la composition du mélange se séparant théoriquement en deux phases de même composition et de même volume. Le point seuil donne la concentration minimale totale en polymères conduisant à une séparation de phase.

1.3.1.2.4 Aspect cinétique

La binodale représente donc l'équilibre thermodynamique ($\Delta G = 0$) (Jones et McClements, 2010). Les systèmes incompatibles proches de la binodale ne se séparent pas spontanément. La séparation de phase demande un site de nucléation pour être déclenchée et croître dans un second temps : séparation par nucléation et croissance (Norton et Frith, 2001). Au-delà de cette zone proche de la binodale (délimitée par une courbe appelée spinodale), la séparation de phase est spontanée selon un mécanisme de décomposition spinodale (Turgeon *et al.*, 2003).

Dans ce dernier cas, le système se sépare rapidement. Il est caractérisé par une structure avec des dimensions régulières. Par exemple, si ce sont des gouttelettes qui sont formées, elles sont à peu près régulièrement espacées et de tailles semblables. Initialement, l'interface entre les phases est diffuse. Les zones vont ensuite se concentrer sans évolution de taille jusqu'à atteindre leurs compositions d'équilibre (**Figure 1.19.a**) (Butler et Heppenstall-Butler, 2003 ; Jones et McClements, 2010). Les morphologies finales des systèmes se déphasant selon ce modèle peuvent être des réseaux bi-continus ou des gouttelettes dispersées.

Dans la zone située entre la spinodale et la binodale, le système est métastable et la séparation se fait selon le mécanisme de nucléation et croissance (**Figure 1.19.b**). Dans le but de compenser cet état thermodynamiquement instable, une interface se forme sous forme de gouttelettes appelées noyau (Donato, 2004). Les noyaux qui ont une importance suffisante grossissent de façon aléatoire, les plus petits sont re-dissous et disparaissent (Butler et Heppenstall-Butler, 2003). Ces systèmes forment initialement des émulsions eau dans eau avec de larges gouttelettes qui finissent par coalescer (John et McClements, 2010).

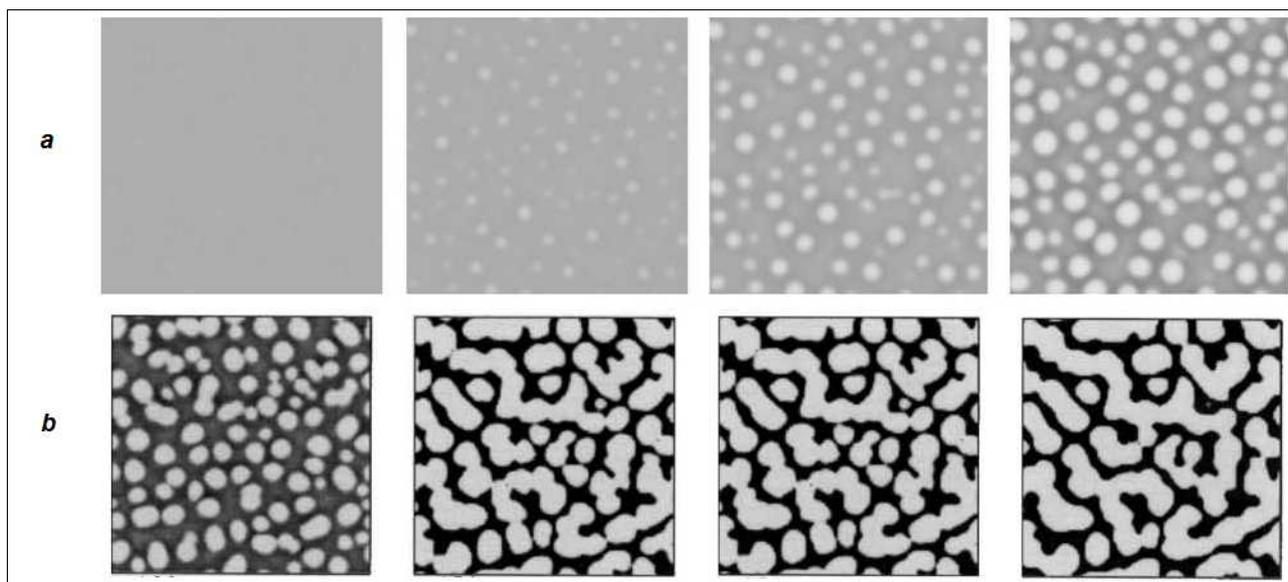


Figure 1.19 Représentation schématique du mécanisme de décomposition spinodale (a) et de nucléation et croissance (b).

Les deux différents mécanismes peuvent donner des structures finales identiques. Si le système reste liquide, une sédimentation finira par se produire, conduisant à une séparation de phase en masse quel que soit le mécanisme initial de séparation de phase (Butler et Heppenstall-Butler, 2003).

Selon le mécanisme, pour utiliser cette variété de structures intermédiaires, la séparation de phase peut être bloquée au niveau d'une étape spécifique, par exemple par un phénomène de gélification (Turgeon *et al.*, 2003 ; Butler et Heppenstall-Butler, 2003 ; John et McClements, 2010).

1.3.1.2.5 Méthodes analytiques de caractérisation des séparations de phase

Pour caractériser le comportement de phase, la morphologie ainsi que les propriétés des systèmes thermodynamiquement incompatibles, de nombreuses méthodes analytiques sont nécessaires. Un système polymérique biphasique tend à se séparer en une phase supérieure et une phase inférieure du fait de la différence de la densité entre les phases (Jones et McClements, 2010). Ce processus se fait naturellement du fait de la gravité, mais pour obtenir la séparation complète, cela peut prendre un temps conséquent surtout si la phase polymérique externe a une forte viscosité ou des caractéristiques semblables à un gel. Dans ces conditions, la centrifugation peut être utilisée pour accélérer la séparation. Une fois que le mélange est séparé en deux phases (une supérieure, une

inférieure), chacune peut être isolée et leur composition peut être déterminé en utilisant des méthodes standards chimiques, gravimétriques, spectroscopiques ou encore chromatographiques (Blonk *et al.*, 1995 ; Capron *et al.*, 2001 ; Redigueri *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2009 ; Nono *et al.*, 2011). Les propriétés physico-chimiques de chaque phase polymérique peuvent être mesurées comme l'indice de réfraction, la densité, le comportement rhéologique (Capron *et al.*, 2001 ; Redigueri *et al.*, 2007). Ces informations peuvent être importantes si l'objectif est de mettre au point des systèmes polymériques particuliers avec des propriétés spécifiques. La morphologie (microstructure) peut être suivie pendant la séparation de phase ou après application de forces de cisaillement en utilisant des méthodes de diffusion (Capron *et al.*, 1999 ; De Kruif et Tuinier, 1999 ; Tuinier *et al.*, 2000 ; Butler et Heppenstall-Butler, 2003) ou de microscopie comme la diffusion de la lumière aux petits angles ou la microscopie confocale (Loren *et al.*, 1999 ; Norton et Frith, 2001 ; Butler et Heppenstall-Butler, 2003 ; Redigueri *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2009 ; Nono *et al.*, 2011). La force conduisant à la séparation de phase peut être caractérisée par l'énergie interfaciale à l'interface entre les deux phases (Van Puyvelde *et al.*, 2001).

1.3.2 Les biopolymères étudiés

Dans le cadre de cette étude, il a été choisi de travailler avec un système bipolymérique sur lequel une littérature conséquente a déjà été écrite : alginate de sodium / caséinate de sodium. En effet, la caractérisation physico-chimique du système n'étant pas l'objectif principal de ce travail, il était primordial de pouvoir s'appuyer sur des connaissances existantes. Par exemple, le diagramme de phases de ce système a été décrit à plusieurs reprises : Antonov *et al.* (1980), Blonk *et al.* (1995), Capron *et al.* (2001), Simeone *et al.* (2004), Antonov et Friedrich (2007), Antonov et Moldenaers (2011). De plus, le système alginate de sodium / caséinate de sodium a un comportement de séparation de phase thermodynamique typique (Antonov et Moldenaers, 2011) et est pertinent pour de nombreuses applications en industrie agroalimentaire (propriété de texture et de structure).

1.3.2.1 L'alginate de sodium

1.3.2.1.1 Description générale

Les polyosides utilisés en agroalimentaire sont issus de l'amidon et d'autres biopolymères obtenus à partir de graines (gomme de guar), de microorganismes (gomme de xanthane), d'algues (alginate, carraghénane), de plantes (cellulose et ses dérivés) (Soma *et al.*, 2009). Pour la

formulation de solutions filmogènes ou de matrices d'encapsulation, l'alginate est le polysaccharide le plus souvent cité (utilisé sous forme d'alginate de sodium) (Scannell *et al.*, 2000b ; Sonomoto *et al.*, 2000 ; Concha-Meyer *et al.*, 2011 ; Bevilacqua *et al.*, 2010 ; Brachkova *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2008 ; Rhim, 2004 ; Zactiti et Kieckbusch, 2006). Dans le domaine des probiotiques, notamment, c'est l'agent d'encapsulation le plus utilisé par les chercheurs.

L'alginate est la base conjuguée de l'acide alginique qui est extrait de différentes espèces d'algues brunes (ex. *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*) (Gombotz et Wee, 2012). Après neutralisation avec du carbonate de sodium ou de l'hydroxyde de sodium, l'acide alginique forme un produit stable et soluble dans l'eau, l'alginate de sodium. L'alginate est composé d'acide α -L-guluronique (G) (pKa de 3,65) et d'acide β -D-mannuronique (M) (épimère en C₅ de G) (pKa de 3,38). La position du groupement carboxylate impose une liaison équatoriale/équatoriale entre monomères M, d'une liaison axiale/axiale entre les monomères G et axiale/équatoriale entre M et G (inversement entre G et M) (**Figure 1.20**). La structure linéaire de l'alginate consiste soit en des blocs homopolymériques d'acide β -D-mannuronique (M) ou d'acide α -L-guluronique (G), soit en des blocs hétéropolymériques alternant M et G liés par des liaisons 1,4-glycosidiques. L'alginate est donc un hydrocolloïde polyanionique (Soma *et al.*, 2009). L'alginate a un poids moléculaire compris entre 50 et 420 kDa et en moyenne de 150 kDa (Stokke *et al.*, 2000). La fréquence des différentes séquences dimériques et trimériques (GG, MM, MG, GM, GGG, GGM/MGG, MGM) peut être mesurée pour caractériser l'alginate par spectroscopie RMN¹H haut champs.

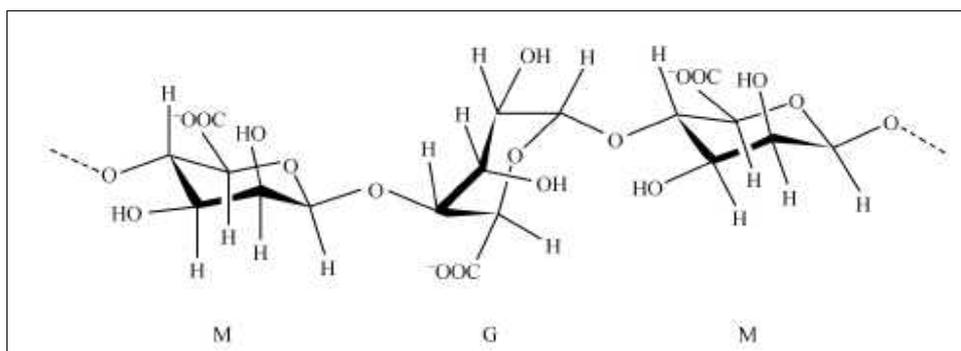


Figure 1.20 Structure de l'alginate, bloc hétéropolymérique (d'après Soma *et al.*, 2009).

G : unité α -L-guluronique ; M : unité β -D-mannuronique.

La flexibilité de l'alginate en solution est d'autant plus grande que la fréquence des blocs MG est plus importante que celle des blocs MM, elle-même plus importante que celle des blocs GG (Gombotz et Wee, 2012).

1.3.2.1.2 Mécanisme de gélification

L'alginate a la propriété de former des gels en contrôlant l'apport en ions bivalents. L'alginate gélifié est très utilisé dans les domaines pharmaceutique et alimentaire du fait des atouts suivants (Gombotz et Wee, 2012) :

- (i) à l'intérieur de la matrice, le milieu aqueux est relativement inerte (les billes d'alginate contiennent typiquement plus de 95 % d'eau) ;
- (ii) la procédure d'encapsulation se fait à température ambiante et sans solvant organique ;
- (iii) la porosité du gel est élevée permettant la diffusion de macromolécules ;
- (iv) il y a une possibilité de contrôler la porosité par l'ajout d'un revêtement ;
- (v) le système est biodégradable.

L'alginate est souvent gélifié sous forme de billes par extrusion de la solution gélifiante dans une solution de cations bivalents (Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+}). Les cations monovalents et Mg^{2+} n'induisent pas de gélification et, Ba^{2+} et Sr^{2+} produisent des gels plus forts que Ca^{2+} (Siew *et al.*, 2005 ; Gombotz et Wee, 2012). Ce sont les blocs d'unité G qui interagissent prioritairement avec les ions bivalents pour former des structures en « boîtes à œufs » aux zones de jonction (**Figure 1.21**) (Grant *et al.*, 1973 ; Morris *et al.*, 1978).

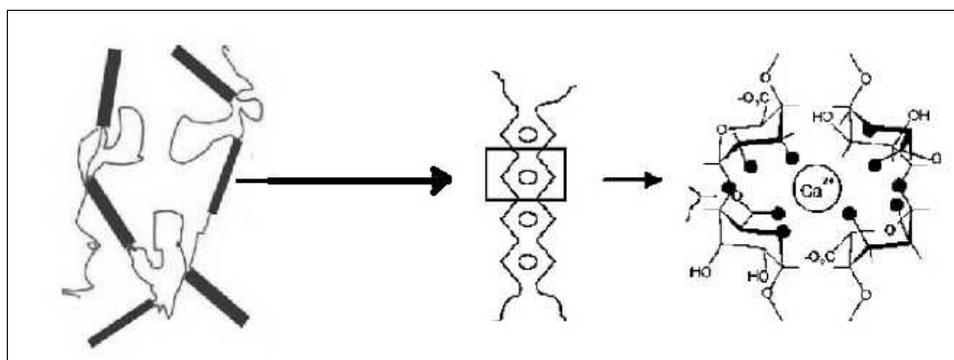


Figure 1.21 Représentation schématique de l'association boîtes à œufs des séquences poly-L-gulonates de l'alginate réticulé par des ions calcium (d'après Li *et al.*, 2007).

(Les atomes d'oxygène impliqués dans la sphère de coordination sont représentés par des cercles pleins.)

La longueur des blocs homopolymériques G est un paramètre clé concernant les interactions entre les ions et les chaînes d'alginate : le bloc doit être au moins composé de 20 monomères. Les propriétés physiques dépendent aussi de la composition, de la structure et du poids moléculaire du polymère (Gombotz et Wee, 2012). Pour obtenir des billes avec des propriétés mécaniques fortes,

un faible taux de contraction, une importante porosité et une meilleure stabilité vis-à-vis des cations monovalents, l'alginate doit être composé à plus de 70 % d'unités G et la longueur moyenne de ses blocs GG doit être de plus de 15 unités (Gombotz et Wee, 2012). Un gel réalisé à partir d'un alginate riche en G sera rigide et fragile, alors qu'un gel réalisé à partir d'un alginate pauvre en G sera plus déformable (Gombotz et Wee, 2012).

Les gels d'alginate de calcium peuvent être dissous en présence d'agents chélatants (lactate, citrate, phosphate) ou par une solution fortement concentrée en ions (Na^+ , Mg^{2+}). Par exemple, en plus ou moins de temps selon leur force, ils peuvent être dégradés dans un tampon phosphate à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et complètement dissous dans une solution citrate de sodium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à un pH de 7,8 (Gombotz et Wee, 2012).

1.3.2.2 Les caséinates de sodium

Les protéines sont également des polymères très utilisées dans le domaine agroalimentaire avec notamment les protéines de lait. Le secteur de l'industrie alimentaire est le premier secteur d'activités utilisateur de protéines laitières en raison de leurs nombreuses fonctionnalités : solubilité à pH neutre, propriétés gélifiantes, aptitude à texturer les aliments, propriétés interfaciales (émulsifiantes et moussantes) (Lepoudère *et al.*, 2012).

Le lait est constitué de deux fractions protéiques principales (Matéos, 2008) :

- une fraction soluble, représentant environ 20 % : les protéines lactosériques ;
- une fraction colloïdale, représentant 80 % : les caséines.

La fraction protéique des caséines précipite à pH 4,6 et à 20°C pour la lait écrémé bovin (Matéos, 2008). C'est un mélange de quatre protéines multiphosphorylées : $\alpha_{\text{S1-}}$, $\alpha_{\text{S2-}}$, β - et κ -caseine (Srinivasan *et al.*, 2002) pour une masse molaire d'environ $2.10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ (Nono *et al.*, 2011). Dans le lait, les caséinates sont organisées sous forme de micelles (d'un rayon de 100 nm (Nono *et al.*, 2011)) et s'associent à un complexe minéral de phosphate de calcium. L'intégrité des micelles est due à des interactions hydrophobes, électrostatiques et à des liaisons hydrogènes (Cuomo *et al.*, 2011).

Les caséines sont le plus souvent utilisées comme ingrédients sous la forme de caséinates de sodium (propriétés émulsifiantes, viscosantes) ou de calcium (texturants). Pour obtenir ces dernières, le lait écrémé est acidifié à pH 4,6 (point isoélectrique des caséines). Trois procédés peuvent être utilisés : acidification par des acides forts (HCl ou H_2SO_4), acidification par voie biologique, acidification par résine échangeuses d'ions (Lepoudère *et al.*, 2012). A ce pH (4,6), le

complexe micellaire est détruit, les caséines s'agrègent et précipitent sous forme d'un coagulum. Après la précipitation, le coagulum est séparé du lactosérum acide par centrifugation, puis il est lavé à l'eau pour la débarrasser du lactose, des sels et de l'acide. La caséine acide contient alors 50 % d'eau et deux cas de figure se présentent. Soit la caséine est séchée et broyée, de la caséine acide commerciale est obtenue ; soit il est possible de solubiliser la caséine acide par neutralisation. Selon la nature de la base, il est possible d'obtenir des caséinates de sodium (hydroxyde de sodium), de potassium (hydroxyde de potassium) ou de calcium (hydroxyde de calcium).

La forme « caséinates de sodium » est la plus communément rencontrée (Fabra *et al.*, 2010). Sous cette dernière forme, l'organisation supra-moléculaire a été perdue, c'est-à-dire que la structure en micelles n'existe plus. Les caséinates de sodium forment des petites particules d'environ 11 nm de rayon (Nono *et al.*, 2011). Le point isoélectrique est autour de 4,7-5,2 (Capron *et al.*, 2001). Les propriétés des caséinates sont les suivantes : solubles dans une large gamme de pH, stables aux traitements thermiques, rétenteurs d'eau. De par leurs structures, elles ont la capacité de former des liaisons hydrogènes, électrostatiques et hydrophobiques intermoléculaires. Cela augmente donc la cohésion entre les chaînes (Avena-Bustillos et Krochta, 1993 ; Brault *et al.*, 1997 ; Chen, 2002). De ce fait, elles sont utilisées actuellement dans la formulation de films comestibles (Gialamas *et al.*, 2010). Néanmoins, leur nature hydrophile limite leur capacité de barrière à l'humidité en comparaison avec les films plastiques communément utilisés (Fabra *et al.*, 2010). Cela reste une contrainte pour développement de tels films. D'autres systèmes sont envisagés mélangeant protéine et polyside.

1.3.3 Les mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium

1.3.3.1 Comportement de phase des systèmes alginate de sodium/caséinate de sodium

De nombreuses données sont disponibles à propos du diagramme de phases, de la viscosité à l'équilibre et de la tension interfaciale des systèmes aqueux alginate de sodium / caséinate de sodium à pH neutre (Pacek *et al.*, 2000 ; Capron *et al.*, 2001 ; Guido *et al.*, 2002 ; Simeone *et al.*, 2002 ; Simeone *et al.*, 2004 ; Caserta *et al.*, 2005 ; Antonov et Friedrich, 2007 ; Antonov et Moldenaers, 2011 ; Sosa-Herrera *et al.*, 2012).

Capron *et al.*, 2001, ont été de ceux qui ont établi un diagramme de phases à 20°C dans l'eau. La séparation de phase a été accélérée par centrifugation (jusqu'à ce que les volumes

n'évoluent plus). La phase riche en alginate est la phase du dessus et la phase riche en caséinate (légèrement brune) est la phase inférieure (Capron *et al.*, 2001 ; Antonov et Friedrich, 2007). Les concentrations en polymères de chaque phase ont été déterminées par mesure UV corrigée avec la turbidité. Les lignes de conjugaison ne sont pas parallèles. Les auteurs ont interprété le diagramme selon l'approche thermodynamique développée par Edmond et Ogston (1968) pour décrire la binodale. D'après les résolutions des équations, l'eau apparaît comme un bon solvant puisque les interactions polymère/solvant sont plus favorables que celles entre polymères. Dans ce système le polymère le moins hydrophile est la caséinate. D'après la théorie de Flory-Huggins (1942), la séparation de phase des systèmes ternaires est due fortement à l'asymétrie des interactions solvant/polymère 1, solvant/polymère 2 qui existe naturellement entre protéine et polyside. Du fait de ces différences d'affinités thermodynamiques, le diagramme de phases n'est pas symétrique : la distribution du solvant entre les deux phases est en faveur de la phase riche en polymère hydrophile, l'alginate dans ce cas.

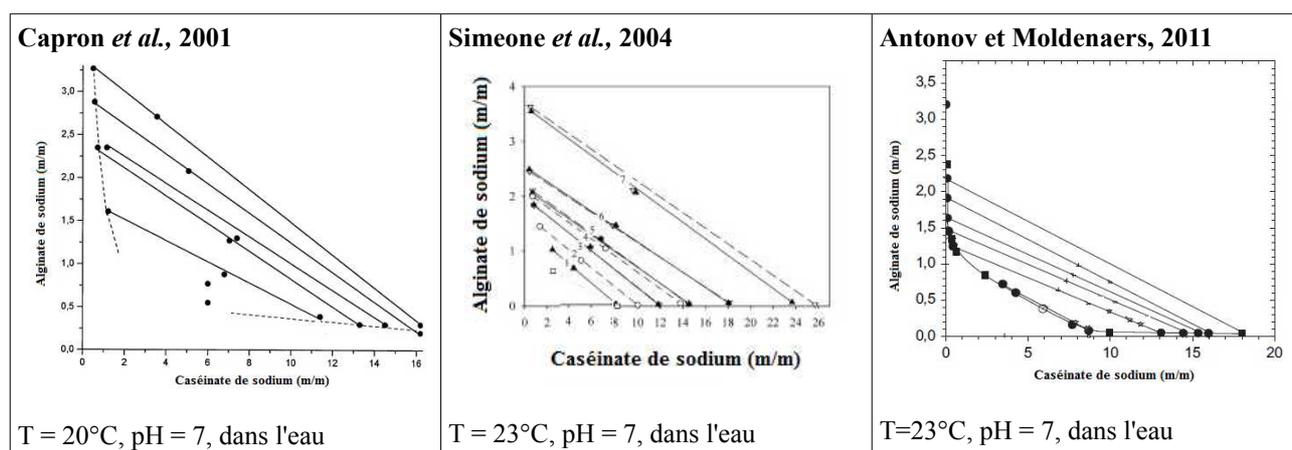


Figure 1.22 Diagrammes de phases issus de la littérature du système aqueux alginate de sodium/caséinate de sodium.

La comparaison quantitative des différents diagrammes reste difficile car les résultats dépendent du poids moléculaires, de la distribution des masses, des structures des différents polymères (dépendant de la source (c'est-à-dire du fournisseur)), mais aussi des méthodes de mesure utilisées, du solvant, du pH, de la température, ... (Simeone *et al.*, 2004). Malgré une certaine dispersion, les données de la littérature sont assez cohérentes et impliquent que la séparation de phase pour le système alginate de sodium / caséinate de sodium se produit uniquement si la concentration en polymères dépasse certaines valeurs relativement élevées (Pacek *et al.*, 2000).

Les études rhéologiques ont montrés que les deux phases après séparation avaient un comportement rhéofluidifiant néanmoins, plus prononcé pour la phase riche en alginate. Au-dessus de 200 s^{-1} , la phase riche en caséinate apparaît plus visqueuse que la phase riche en alginate (Capron *et al.*, 2001).

Pour les phases riche en caséinate :

- si la concentration en caséinate est importante, la viscosité est semblable à une solution de caséinate seule,
- si la concentration en caséinate est faible, la viscosité est plus importante que celle d'une solution de caséinate seule.

L'alginate même s'il n'est présent qu'en très faible quantité joue un rôle important en terme de viscosité, c'est un épaississant beaucoup plus efficace que la caséinate (Simeone *et al.*, 2004). De plus, à faible concentration en biopolymère, la phase riche en alginate est plus visqueuse tandis que pour les fortes concentrations en biopolymères, la phase riche en caséinate est plus visqueuse (Simeone *et al.*, 2004).

Les microstructures observées dans la littérature sont données dans des travaux s'intéressant à la tension interfaciale. Pour un mélange de 1 % (m/m) d'alginate/ 6 % (m/m) de caséinate, la microstructure observée est une microstructure de type émulsion avec une phase dispersée de caséinate sous forme de gouttelettes dans une phase continue d'alginate (Guido *et al.*, 2002 ; Simeone *et al.*, 2002). Ce système a une force interfaciale très faible et donc difficile à mesurer. Les propriétés interfaciales des caséinates résultent de la présence à la fois de résidus d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes (Simeone *et al.*, 2002). Pour des systèmes éloignés de la binodale, la tension interfaciale est de l'ordre de 10^{-6} N.m^{-1} et pour des systèmes proches du point critique de l'ordre de 10^{-8} N.m^{-1} (Guido *et al.*, 2002 ; Antonov *et al.*, 2004).

1.3.3.2 Gel mixte

Depuis trois ou quatre décennies, l'attention des chercheurs pour les gels mixtes n'a fait qu'augmenter notamment pour le domaine de formulation alimentaire (développement de nouveaux additifs, de nouveaux procédés, ...) (Zasytkin *et al.*, 1997). Un gel mixte est défini comme étant composé de deux réseaux qui s'étendent sur l'ensemble du système et peut aussi être appelé « gel interpénétré » (Morris, 1985). La gélification d'un ATPS (« Aqueous Two-Phase System » (comme une émulsion eau dans eau contenant deux biopolymères co-solubles) peut former un gel mixte (Zasytkin *et al.*, 1997).

Malgré cet intérêt, peu de travaux sont relatés à propos de gels mixtes alginate de sodium/caséinate

de sodium. Roberts *et al.*, en 2000, ont étudié les propriétés de texture de gels d'alginate, caséinate et amidon en gélifiant par ajout de Ca^{2+} . Le mélange alginate/caséinate a montré des propriétés semblables au liquide jusqu'à une concentration en Ca^{2+} de 200 ppm. Au-delà, un gel se forme avec une matrice d'alginate continue comportant des inclusions de caséinate (se comportant comme un liquide). En jouant sur les compositions en biopolymères et les concentrations en calcium, une multitude de textures peut être obtenue. Elles sont régies principalement par la phase alginate et les propriétés séquestrantes des caséinates. En effet, Roberts *et al.*, 2000, ont montré que les groupements sulfates des caséinates jouaient un rôle d'agent séquestrant des ions calcium, ce qui améliorerait la tolérance de l'alginate à l'effet des ions calcium. Pour une même concentration en ions calcium, le gel mixte alginate/caséinate sera moins fort qu'un gel d'alginate uniquement.

1.4 Conclusion

1.4.1 Bilan de l'état de l'art

La diversification des systèmes de conservation apparaît comme une nécessité pour réduire les contaminations (qui sont en recrudescence dans les pays développés depuis une dizaine d'années), pour améliorer les performances, pour limiter les mécanismes de résistances. Pour cette catégorie de maladie, la listériose, dont *Listeria monocytogenes* est l'agent étiologique, est la deuxième cause de mortalité. C'est pourquoi cette souche a été considérée comme souche cible dans ce travail.

Certaines souches de bactéries lactiques (LAB) peuvent donc être considérées comme bioprotectrices. Différents mécanismes mis en œuvre par leur métabolisme permettent une inhibition d'espèces microbiennes phylogénétiquement proches présentant un risque dans le domaine agroalimentaire comme par exemple *Listeria*. Certains métabolites antimicrobiens qui sont produits par les LAB, sont dès à présent utilisés pour la conservation des aliments. Trois stratégies sont actuellement envisagées en utilisant principalement leur production de bactériocines :

- ajout direct de bactériocine dans l'aliment,
- ajout des bactéries protectrices dans l'aliment (culture starter ou protectrice),
- incorporation de la bactériocine dans l'emballage.

Concernant ce dernier point, de nombreux verrous empêchent cette stratégie de progresser. En effet, 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. Considérées comme GRAS, les LAB pourraient être incorporées entières dans de tels emballages. En plus de cet aspect législatif, l'incorporation de cellules entières montreraient plusieurs points positifs :

- Les mécanismes antimicrobiens seraient multiples : compétition nutritionnelle et pour l'espace, acidification, production de métabolites antimicrobiens (bactériocines, peroxydes, ...). Cela pourrait limiter les phénomènes de résistance des souches cibles.
- La réponse antimicrobienne serait plus appropriée : en effet, la croissance et l'activité métabolique des LAB sont favorisées par les mêmes facteurs environnementaux (remontée en température et/ou humidité, présence de substrats de croissance) que ceux qui stimulent le développement de flores pathogènes ou d'altération. Par exemple, lors d'une rupture de chaîne de froid, le métabolisme des LAB se déclencherait et la diffusion des antimicrobiens interviendrait à un moment plus ciblé.
- Les étapes de production, récupération, purification, incorporation de la bactériocine seraient supprimées.
- En développant un microenvironnement approprié aux LAB, elles pourraient assurer une production et un relargage sur un temps plus long par rapport à un emballage contenant seulement l'antimicrobien.

En s'inspirant des travaux réalisés sur l'immobilisation des LAB dans les domaines des biotechnologies et des probiotiques, le confinement des LAB pour le domaine de la préservation est une voie originale à développer. Les matrices d'immobilisation de molécules biologiques développées sont généralement à base de polysides et/ou protéines déjà utilisés en agroalimentaire. Les mélanges de biopolymères (polyoside/protéine) peuvent présenter plusieurs comportements : miscibilité, séparation de phase associative, séparation de phase ségrégative. La nature des biopolymères et les conditions environnementales le déterminent. Néanmoins, dans un grand nombre de cas, les mélanges de biopolymères tendent à se séparer. Des modèles thermodynamiques ont été établis pour décrire cette séparation. Ces mélanges polyoside/protéine incompatibles permettent de créer une importante variété de microstructures qui pourraient servir pour une localisation préférentielle des cellules et leur protection. Ils ont été envisagés pour l'incorporation de cellules bactériennes en premier lieu pour effectuer des séparations de matériel biologique. Les rares travaux s'intéressant à la localisation des cellules microbiennes dans des systèmes dispersés complexes concernent les produits fermentés. Pour réaliser ce projet d'immobilisation de LAB

bioprotectrices, un système biopolymérique incompatible a été choisi. Le système alginate de sodium / caséinate de sodium étant un système relativement bien décrit dans la littérature, composés de deux polymères de qualité alimentaire, est le système utilisé dans cette étude. En effet, le sujet de ce travail n'était pas d'étudier un système incompatible (ceci étant un sujet en soi) mais plutôt de s'appuyer sur ces travaux pour l'utiliser comme matrice d'immobilisation. De plus, l'alginate de sodium est facilement gélifiable en présence d'ions bivalents.

1.4.2 Approche méthodologique

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier un système d'immobilisation de cellules de LAB productrices de substances antimicrobiennes naturelles. Notre approche méthodologique est présentée **Figure 1.23**. Il a fallu sélectionner des souches de LAB bioprotectrices contre *Listeria* spp. parmi la collection du laboratoire BioDyMIA et une pré-sélection fournie par Actalia (partenaire du projet). Deux souches de *Lactobacillus paracasei* et une souche de *Lactococcus lactis* ont été identifiées comme ayant une activité anti-*Listeria* spp. remarquable. D'un autre côté, la matrice de confinement alginate de sodium/caséinate de sodium a été mise en œuvre (sous forme liquide et gélifiée), puis fonctionnalisée avec les surnageants de culture des LAB ou avec les cellules entières. Le potentiel bioprotecteur de ces matrices a été étudié en s'intéressant à divers aspects : activité anti-*Listeria* spp. (méthode de diffusion sur milieu gélosé), comparaison des propriétés de diffusion des matrices d'alginate de sodium et d'alginate de sodium/caséinate de sodium, microstructures des systèmes et localisation des cellules (étude en microscopie confocale), viabilité des cellules (suivi sur 12 jours, dénombrement sur gélose, microscopie confocale et analyses d'images sur les systèmes liquides). Ces différents axes nous ont permis d'essayer de comprendre les phénomènes influant sur l'efficacité antimicrobienne de tels systèmes.

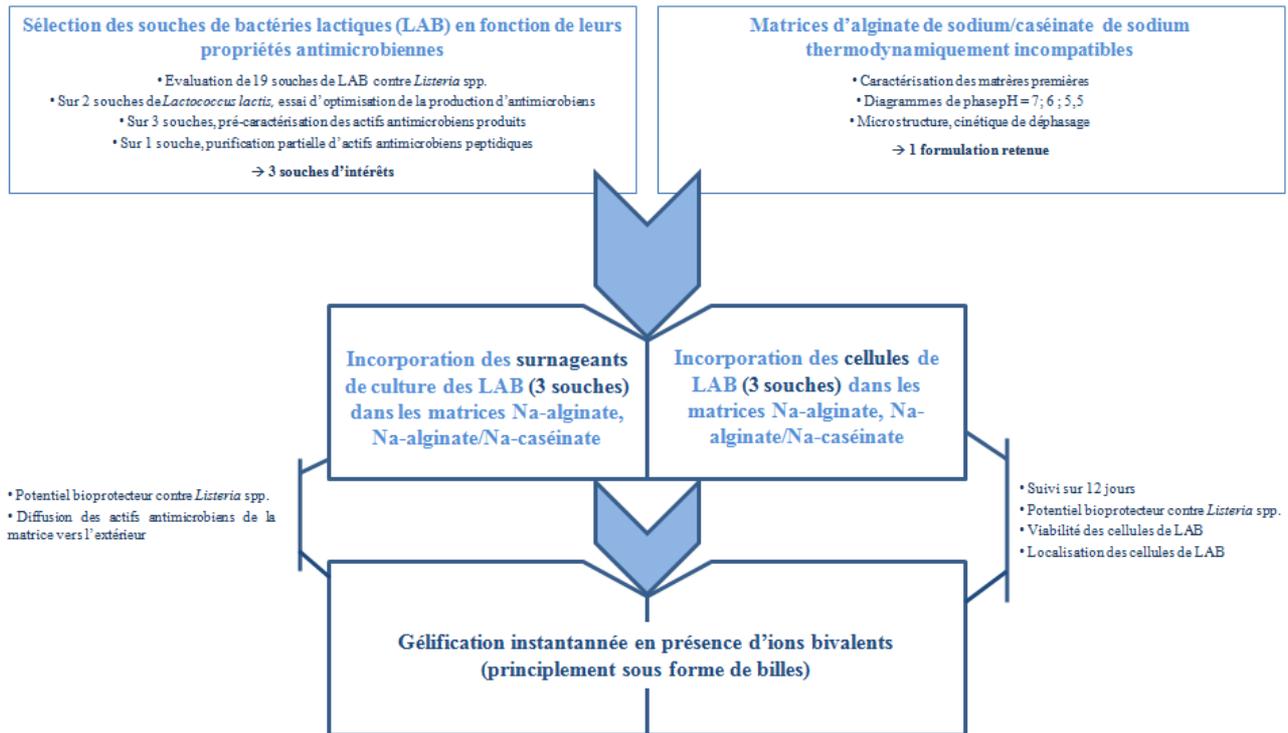


Figure 1.23 Approche méthodologique mise en œuvre dans la présente étude.

CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes

Ce chapitre est consacré aux méthodes employées dans le cadre de ce travail de thèse. Dans une première partie, les différentes souches bactériennes (souches cibles et souches de LAB) utilisées seront présentées ainsi que les méthodes de caractérisation de leurs propriétés de surface. Dans une deuxième partie, la caractérisation du mélange alginate de sodium/caséinate de sodium sera développée.

Par la suite, la préparation des échantillons d'intérêt pour leur activité antimicrobienne seront mis en avant (surnageants de culture bactériennes de LAB, matrices polymériques liquides et gélifiées incorporant des surnageants de culture et des cellules de LAB), ainsi que les tests de diffusion en milieu gélosé utilisés pour sonder leur potentiel antimicrobien. La viabilité des cellules confinées dans les matrices (liquides et gélifiées) et l'activité antimicrobienne de telles matrices ont été suivi sur 12 jours. Les outils de microscopie (microscopie confocale à balayage laser et microscopie électronique à balayage) utilisés pour étudier les microstructures des systèmes polymériques sans cellules de LAB et avec cellules de LAB seront présentés.

Enfin dans une dernière partie, les méthodes mises en œuvre pour la caractérisation des métabolites antimicrobiens produits par les souches de LAB responsables de l'activité bioprotectrice seront décrites.

2.1 Microorganismes testés, milieux et conditions de croissance

2.1.1 Souches bioprotectrices : bactéries lactiques (LAB)

Ce travail a été réalisé en partant initialement de 19 souches de bactéries lactiques, dont 14 fournies par Actalia (partenaire du projet), 4 souches commerciales et 1 souche de collection internationale (**Tableau 2.1**).

Tableau 2.1 Référence des souches de LAB étudiées.

Souches Actalia	Code	Souches commerciales	Code
<i>Lactobacillus fermentum</i>	S1	2 <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	LAB1
	S6		LAB2
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	S2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	LAB3
	S4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	LAB4
	S7		
	S8	Souche de collection internationale	
	S9	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	Lact ATCC
	S11		
S12			
<i>Lactobacillus paracasei</i>	S3		
	S5		
<i>Lactobacillus crispatus</i>	S10		
<i>Lactobacillus curvatus</i>	S13		
<i>Enterococcus faecalis</i>	S14		

LAB1 : Holdbac™ Protective Culture (Danisco, DuPont Nutrition & Health, France)

LAB2 : AIC01 (Wiesby GmbH & Co, Niebüll, Allemagne)

LAB3 : « starter » commercial MD089 (Ezal line, Rhône Poulenc, Dangé Saint-Romain, France) (Lamboley *et al.*, 1997)

LAB4 : CPBL73

Toutes les souches de LAB ont été cultivées dans le bouillon « De Man Rogosa and Sharp » (De Man *et al.*, 1960) (MRS_b) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France). La souche S14 a été cultivée dans du bouillon Tryptone Soja (TSB) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) et du MRS_b et, la souche Lact ATCC a été cultivée dans du milieu M17 (Biokar Diagnostic, Beauvais, France). La composition de chaque milieu utilisé est présentée dans l'annexe 1.

Les souches étudiées ont été conservées à -20°C dans les milieux de croissance stériles, milieux précisés plus haut, supplémentés de 15 % (v/v) de glycérol. Les stocks ont été réalisés par mise en suspension des microorganismes, dans leurs milieux respectifs stériles, récupérés par une

centrifugation à 5 000 g, 15 min à 4°C (SIGMA 3K18, Bioblok Scientific) à la suite d'une pré-culture de 24h à 37°C en anaérobiose suivie d'une culture de 24h à 37°C en anaérobiose.

2.1.2 Souches cibles

Les tests antimicrobiens ont été réalisés sur différentes souches du genre *Listeria* : *L. innocua* LRGIA01 (Chadeau *et al.*, 2010) et *L. innocua* ATCC 33090 (modèles non pathogènes de *L. monocytogenes*), et *L. monocytogenes* S162 (Mariani *et al.*, 2011) dont les caractéristiques et les origines sont présentés dans le **Tableau 2.2** suivant. Ces espèces microbiennes représentent des espèces pathogènes ou d'altération dans l'environnement agroalimentaire. Une autre souche a été utilisée, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, pour sa sensibilité à la Nisine A (Mota-Meira *et al.*, 2000).

Tableau 2.2 Principales caractéristiques et origines des souches bactériennes cibles.

Références des souches	Origine de la souche ou collection	Principales caractéristiques
<i>Listeria innocua</i> LRGIA01	Environnement laitier	Bacille à Gram +, catalase +
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	« American Type Culture Collection » (ATCC)	Bacille à Gram +, catalase +
<i>Listeria monocytogenes</i> S162 serovar 1/2a	Saumure de fromagerie	Bacille à Gram +, catalase +
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	« American Type Culture Collection » (ATCC)	Coque à Gram+, catalase +

Les souches cibles ont été cultivées en Bouillon Tryptone Soja (TSB) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France). Avant chaque test, elles ont été cultivées dans le milieu de croissance à 5 % (v/v) pendant 7h puis repiquées sur le même milieu à 10 % (v/v) et incubées pendant 14h à 30°C. En parallèle, un isolement sur milieu Tryptone Soja Agar (TSA) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) a été systématiquement effectué pour vérifier la pureté de la culture.

Toutes les souches cibles ont été conservées à -20°C dans leurs milieux de croissance stériles supplémentés de 15 % (v/v) de glycérol. Les stocks ont été réalisés par mise en suspension des microorganismes, dans le TSB (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) stériles, récupérés à la suite d'une pré-culture de 7h à 30°C puis d'une culture de 14h à 30°C après une centrifugation à 5 000 g, 15 min à 4°C (SIGMA 3K18, Bioblok Scientific).

2.1.3 Caractérisation des propriétés de surface de cellules de bactéries lactiques : méthode MATS (« Microbial Adhesion To Solvents »)

Dans le but de caractériser les propriétés de surface des LAB incorporées dans les systèmes polymériques, la méthode MATS a été employée. Il s'agit d'une méthode de partage développée par Bellon-Fontaine *et al.*, 1996, qui permet de déterminer le caractère électron accepteur / électron donneur (acide / base au sens de Lewis) et le caractère hydrophile / hydrophobe des microorganismes.

2.1.3.1 Protocole

Pour la méthode MATS, la culture des cellules a été réalisée de la façon suivante :

- Jour 1 : Un cryotube (1 mL de la souche congelée à -20°C dans leurs milieux respectifs (MRS-, TSB-, ou M17-glycérol) contenant la souche considérée a été décongelé à température ambiante. Le contenu du cryotube décongelé a été placé dans 9 mL de milieu stérile (MRS_b, TSB, M17_b) puis incubé 24h à 30°C en anaérobiose.
- Jour 2 : A partir de la suspension du jour 1, un isolement sur MRS_g, TSA ou M17_g (selon la souche) de la souche à tester a été réalisé puis incubé 24h à 30°C.
- Jour 3 : A partir d'une colonie isolée, 4 tubes de 9 mL de MRS_b, TSB ou M17_b (selon la souche) ont étéensemencés (chacun destiné à l'ajout d'un solvant) avec une colonie par tube puis incubés 24h à 30°C en anaérobiose.
- Jour 4 : Les cellules (suspension du jour 3) ont été centrifugées à 8 500 g, 15 min à 4°C (SIGMA 3K18, Bioblok Scientific). Le culot a ensuite été lavé deux fois dans du tampon phosphate de sodium à 0,1 mol.L⁻¹ à pH = 7,4 puis suspendu de nouveau dans 9 mL de ce même tampon. Le tampon phosphate de sodium est un liquide de force ionique élevée permettant de s'affranchir des interactions électrostatiques entre microorganismes et solvants.

Dans un premier temps la Densité Optique (DO) a été ajustée à 0,4 à 400 nm de façon à avoir environ 10⁹ UFC.mL⁻¹ dans le tampon phosphate de sodium. Cette DO initiale correspond à A0 qui est la densité optique avant ajout de chaque solvant.

Par la suite 0,2 mL de solvant (chloroforme ou hexadécane ou éther ou hexane, pureté > 99 %, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ont été ajoutés à 1,2 mL de suspension bactérienne à une DO de 0,4 à 400 nm. L'ensemble a ensuite été agité à l'aide d'un vortex pendant 90 secondes puis laissé 15 min à température ambiante dans le but de séparer les deux

phases : phase aqueuse et phase solvant. Ensuite, 1 mL de la phase aqueuse a été prélevé et la DO mesuré à 400 nm. Cette DO correspond à A1.

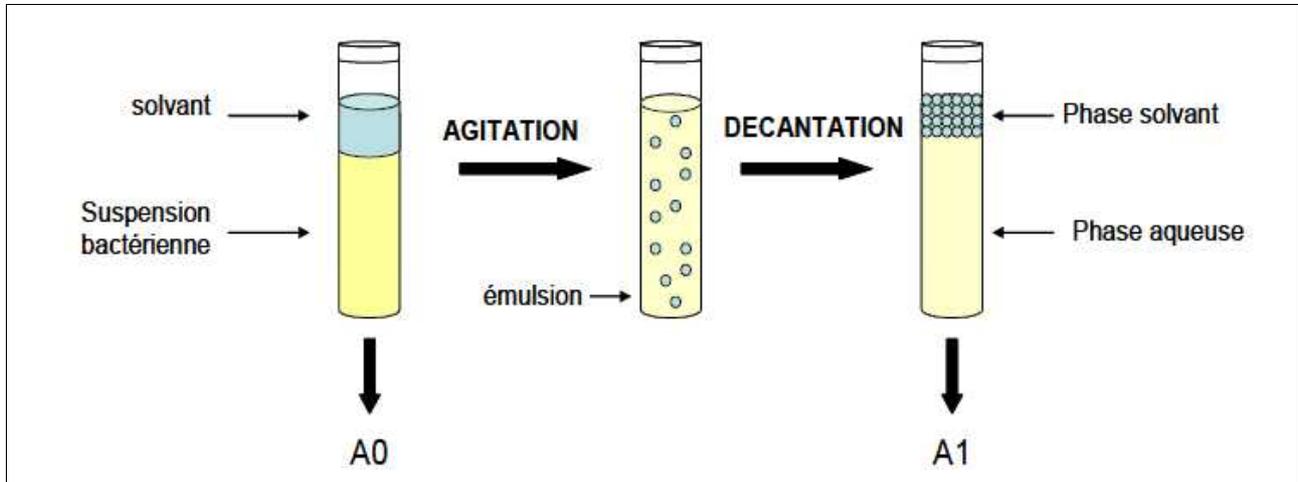


Figure 2.1 Schéma du protocole expérimental de la méthode MATS (Chadeau, 2011).

Le pourcentage d'affinité (%) des bactéries pour les différents solvants testés est donc calculé selon

la formule suivante : $Affinité = (1 - \frac{A1}{A0}) * 100$,

où

- A0 correspond à la DO de la suspension avant ajout du solvant lue à 400 nm,
- A1 correspond à la DO de la phase aqueuse après ajout du solvant lue à 400 nm.

2.1.3.2 Interprétation

Les propriétés des différents solvants utilisés sont les suivantes :

- Chloroforme : solvant monopolaire acide ;
- Ether : solvant monopolaire basique ;
- Hexane et hexadécane : solvants apolaires.

La comparaison des affinités pour ces 4 solvants permet d'avoir les conclusions suivantes.

- **Caractère hydrophile / hydrophobe :**

Si A (hexane) et A (hexadécane) < 50 %, la bactérie est hydrophile.

D'après Bertrand *et al.*, 2003, pour l'hexadécane, lorsque l'affinité (A) est supérieure à 50 %, la bactérie est dite hydrophobe. Si A est inférieure à 20 %, la bactérie est dite hydrophile. Si A est

comprise entre les deux valeurs, la bactérie est dite moyennement hydrophobe (Gibbons et Etherden, 1983 ; Lee et Yii, 1996). Si le pourcentage est faible, cela signifie que la souche testée possède une faible affinité ($< 20\%$) pour le solvant et qu'elle se trouve essentiellement dans la phase aqueuse et inversement si le pourcentage est élevé ($> 20\%$), la souche testée possède une forte affinité pour le solvant et se trouve essentiellement dans la phase solvant.

- **Caractère électron accepteur / électron donneur (acide / base au sens de Lewis) :**

Si $A(\text{chloroforme}) - A(\text{hexane}) > 0$ (ou < 0), la bactérie est basique (ou acide respectivement).

Si $A(\text{éther}) - A(\text{hexane}) < 0$ (ou > 0), la bactérie est non acide (ou non basique respectivement) et cela permet de confirmer la ligne précédente.

2.1.4 Mesure du potentiel Zêta

Le potentiel Zêta permet de caractériser la charge portée par les cellules bactériennes. Expérimentalement, cette technique repose sur la mesure des mobilités électrophorétiques c'est-à-dire la détermination de la vitesse de déplacement d'une particule dans un champ électrique.

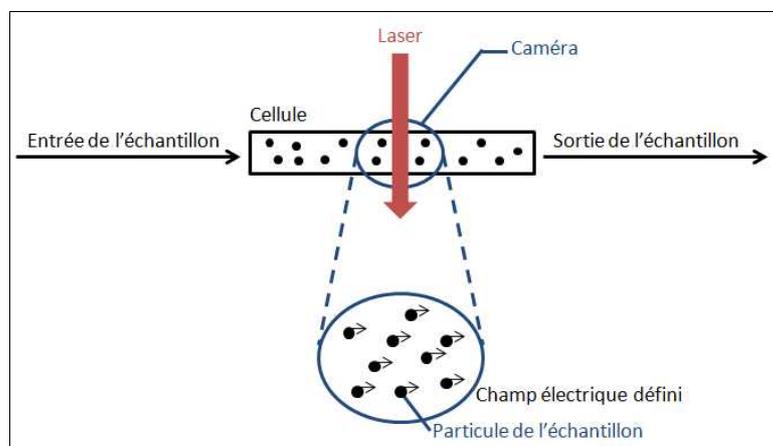


Figure 2.2 Principe de mesure du potentiel Zêta.

Des solutions tampon imidazole/acide acétique (tampon de faible force ionique) à 5 mmol.L^{-1} ont été préparées à différents pH : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Le pH a été ajusté avec des solutions de NaOH à 1 mol.L^{-1} et de HCl à 1 mol.L^{-1} . Les cellules de LAB ont été récupérées après une pré-culture de 24h et une culture de 16h dans du bouillon MRS_b, TSB ou M17_b (selon la souche) à 30°C en anaérobiose. Les cellules ont été remises en solution tampon pour obtenir une concentration finale de $8.10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Les mesures ont été réalisées à l'aide de l'équipement Zêta compact (CAD

Instruments, Les-Essarts-le-Roi, France) et acquises à l'aide du logiciel Zeta compact. L'équation de Smoluchowski a été utilisée pour le calcul du potentiel Zêta (Boonaert *et al.*, 2001).

2.2 Le système biphasique alginate/caséinate

2.2.1 Caractérisation des poudres

Pour ce travail de thèse, une poudre commerciale d'alginate de sodium fournie par Fisher Scientific (Hampton, Hampshire, États-Unis) et une poudre de caséinate de sodium provenant de chez Acros Organics (Geel, Belgique) ont été utilisées. Les caractéristiques de la poudre de caséinate de sodium fournies par le fournisseur sont données dans le **Tableau 2.3** suivant.

Tableau 2.3 Caractéristiques de la poudre de caséinate de sodium Acros Organics (Geel, Belgique) d'après la fiche technique transmise par le fournisseur. (Les pourcentages sont exprimés en m/m.)

Protéine (%)	92
Eau (%)	≤ 6
Cendres (%)	≤ 4
pH	6 – 7,5
Lactose (%)	< 1

2.2.1.1 *Détermination de la matière sèche*

La matière sèche a été déterminée pour chacune des poudres selon la norme NF B 51-004 (AFNOR, 1985). Pour ce faire, 1 g (m_i) de chaque poudre a été pesé dans des coupelles séparées et placées à l'étuve à 104°C pendant 24h. Ensuite, les échantillons ont été récupérés et pesés (m_f). Le taux de matière sèche (MS en %) est obtenu selon la formule suivante :

$$MS = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} * 100$$

2.2.1.2 *Détermination du taux de cendres*

Le taux de cendres correspond au pourcentage de matières minérales. Pour chaque poudre, 1 g a été pesé dans des creusets et placés sur le brûleur électrique pendant 4h. Ensuite, ces échantillons ont été passés à la flamme pour éliminer toute trace de matière carbonée susceptible de

prendre feu dans le four. Les poudres ont par la suite été mises au four à 600°C pendant 20h (d'après la norme NF M 03-003 (AFNOR, 1994)).

2.2.1.3 Taux de protéines

Les teneurs en protéines ont été déterminées par la méthode de Kjeldahl. Cinquante à 600 mg et 50 à 200 mg ont été pesés respectivement pour la poudre d'alginate et pour la poudre de caséinate. Ces quantités ont été introduites dans les matras, puis 10 ml d'acide sulfurique concentré à 95 % et le catalyseur ont été ajoutés. Les matras ont été placés dans le minéralisateur (minéralisateur de type Büchi Digestion unit K-435 à 12 postes de deux blocs, Flawil, Suisse) pendant 4h. Après refroidissement, les matras ont été distillés 5 min après ajout de 50 mL de soude concentrée (à 30 %) (Distillateur Unit K-355, Büchi, Flawil, Suisse). Les distillats ont été recueillis dans 100 mL d'acide borique à 20 g.L⁻¹. Une solution titrante de 0,1 mol.L⁻¹ de HCl a été employée la plupart du temps. Le dosage a été effectué par mesure du pH, ainsi le volume équivalent de HCl a été relevé lorsque le pH est redescendu à la valeur de l'acide borique seul. Le taux de conversion K appliqué est de 6,38 spécifique des protéines laitières (Schuck *et al.*, 2012).

2.2.1.4 Courbe de solubilité des caséinates de sodium en fonction du pH

La solubilité des caséinate de sodium dans un domaine de pH allant de 3 à 8 a été mesurée en mettant en suspension de 25 à 50 mg de poudre dans un volume d'eau, le pH ayant été modifié avec des solutions de NaOH ou HCl à 0,1 M avant de compléter à 10 g de solution finale. Les solutions ont été mises en agitation pendant 2 h à 25°C. Le pH a été contrôlé au bout des 2 h et le cas échéant, il a été réajusté et les solutions correspondantes ont été remises sous agitation. Les solutions ont ensuite été centrifugées (2500 g, 25 min, 25°C). Le contenu en azote (N) des surnageants a été obtenu par la méthode de Kjeldahl (voir 2.1.3). L'index de solubilité d'azote (« Nitrogen Solubility Index », NSI) a été calculé selon la formule suivante :

$$NSI = \frac{N_{dissous}}{N_{initial}}, \text{ avec :}$$

$N_{dissous}$, le pourcentage d'azote dissous dans le surnageant ; $N_{initial}$, le pourcentage d'azote initialement dans la poudre.

2.2.1.5 Analyse RMN¹H de l'alginate

La caractérisation de l'alginate peut aussi être réalisée en quantifiant les fréquences des blocs homopolymériques (sous forme de dimères et de trimères) F_{GG} , F_{GGG} et hétéropolymériques F_{MG} , F_{MGM} , F_{MGG} par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H) à haut champ (600 MHz), dans D₂O, à 90°C, d'après la procédure décrite par Grasdalen *et al.* (1979) et Grasdalen (1983).

Etant donné le caractère épaississant de l'alginate, pour ne pas surestimer les blocs GG, il est nécessaire de procéder à une hydrolyse acide douce d'une solution d'alginate à 1 % (m/m) portée à reflux en présence de HCl à 0,1 mol.L⁻¹. Le pH de la solution a d'abord été abaissé à pH = 5 pendant 10 min puis à pH = 3 pendant 20 min. La solution a alors été neutralisée avec 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH, puis précipitée avec de l'éthanol à 96 %. Après une filtration sur Büchner, le filtrat a été séché à 70°C pendant 14 h. La poudre obtenue a ensuite été solubilisée à 1 % (m/m) dans D₂O. La mesure s'effectue par la suite dans l'enceinte de l'appareil préchauffée à 90°C. La fréquence choisie a été de 500 MHz et 32 scans ont été réalisés.

Les pics caractéristiques à 90°C et dans D₂O de l'alginate préhydrolysé (à 1 % (m/m)) sont identifiés pour des déplacements chimiques de (Grasdalen *et al.*, 1979 ; Grasdalen, 1983) :

- 5,07 ppm pour le proton anomérique H-1 de G (Massif A),
- 4,70 ppm pour le proton anomérique H-1 de M et le proton H-5 de G adjacent à M (Massif B),
- 4,45 ppm pour le proton H-5 de G adjacent à G (Massif C).

Le pic résiduel de l'eau dans le solvant D₂O a été identifié pour un déplacement chimique aux alentours de 4,76 ppm.

Les pics obtenu sur le spectre ont été intégrés pour permettre la mesure de l'aire sous le massif A, B et C. Les différentes fractions en monomères et dimères de l'alginate ont été quantifiées selon les équations suivantes (les lettres A, B, C représente les aires des massifs A, B, C):

$$(1) F_G = \frac{A}{(B+C)}$$

$$(2) F_{GG} = \frac{C}{(B+C)}$$

$$(3) F_M + F_G = 1$$

$$(4) F_{GG} + F_{GM} = F_G$$

$$(5) F_{MM} + F_{GM} = F_M$$

2.2.2 Préparation des solutions mères

La solution d'alginate de sodium (Fisher scientifique, Royaume-Uni) a été préparée à 4 % (m/m) et la solution de caseinate (Acros organic, Belgium) à 20 % (m/m) dans une solution tampon acide acétique/imidazole à 5 mmol.L⁻¹ à pH = 7, puis agitée pendant 14h sur plaque d'agitation (vitesse 3, Heat-Stir, Stuart). Chacune des deux solutions ont ensuite été centrifugées (12 500 g, 15 min, 20°C) (SIGMA 3K18, Bioblok Scientific) pour éliminer les résidus insolubles. Pour les concentrations extrêmes en biopolymères (alginate > 2,5 % (m/m) et caséinate > 7 % (m/m)), les mélanges sont directement préparés à partir des poudres.

2.2.3 Diagrammes de phases

2.2.3.1 Détermination du diagramme de phases par observation macroscopique

Pour établir le diagramme de phase du système Alginate/Caséinate/Eau à 20°C, les solutions mères d'alginate et de caséinate ont été mélangées dans des tubes Falcon de 15 mL pour balayer différentes concentrations en biopolymères. Les tubes ont été vortexés 1 min à la vitesse maximale. Ensuite, les tubes ont été centrifugés (5 000 g, 15 min, 20°C) pour obtenir une séparation de phase nette. La séparation macroscopique complète est atteinte lorsque le volume de la phase supérieure ne diminue plus. Les concentrations en biopolymères où une séparation s'opère et celles où il n'y a pas séparation sont représentées sur un diagramme pour obtenir la délimitation du domaine de compatibilité et d'incompatibilité des deux biopolymères.

2.2.3.2 Diagramme de phases à pH = 7

A partir du diagramme représentant les zones de séparation observées visuellement, six mélanges de compositions différentes ont été choisis pour une quantification (**Tableau 2.4**).

Tableau 2.4 Tableau de composition des mélanges caséinate/alginate choisis pour réaliser le diagramme de phases.

Échantillons	% protéine (m/m)	% polysaccharide (m/m)
1	2	1,5
2	3	1,5
3	4	2
4	5	2
5	7	2,5
6	9	3

La phase supérieure (phase riche en alginate) (obtenue après centrifugation, voir 2.2.3.1) a été récupérée avec une pipette pasteur et placée dans un second tube. La phase inférieure (riche en protéines) a été récupérée soit en perçant le tube lorsque la séparation de phase n'était pas très nette, soit en la laissant dans le tube en prenant soin de bien éliminer l'interface. Dans chaque phase, la teneur en protéine a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (voir 2.2.1.3). Des quantités de 200 à 600 mg de phases ont été pesées pour être introduites dans les matras (m_{initiale}).

$$m_P = M_N * C_{\text{HCl}} * V_{\text{eq}} * 6,38 \quad \text{et} \quad P = \frac{m_P * 100}{m_{\text{initiale}}} \quad (\text{en } \%), \text{ avec :}$$

m_P , la masse de protéine ; M_N , la masse molaire de l'azote ; C_{HCl} , la concentration de la solution titrante ; V_{eq} , le volume équivalent du dosage en fin de Kjeldahl ; P , le pourcentage de protéine dans l'échantillon ; m_{initiale} , la masse initiale de l'échantillon introduite dans le matras.

En parallèle, le taux d'alginate a été déterminé en passant par la détermination des masses sèches. Dans des coupelles préalablement pesées, une quantité de chaque phase (entre 200 et 600 mg) a été prélevée ($m_{\text{pesée}}$). Ces coupelles ont ensuite été mises à l'étuve à 104°C pendant 24h. Les échantillons séchés ont été récupérés et pesés. La masse d'alginate de chacune des phases a été déduite en faisant la différence entre la masse sèche et la masse de protéines.

$$m_{\text{alg}} = MS - \left(m_{\text{pesée}} * \left(\frac{P}{100} \right) \right) \quad \text{et} \quad \text{Alg} = \frac{m_{\text{alg}} * 100}{m_{\text{pesée}}} \quad (\text{en } \%), \text{ avec :}$$

m_{alg} , la masse d'alginate ; MS , la masse sèche ; $m_{\text{pesée}}$, la masse initiale pesée avant la détermination de la masse sèche ; P , le pourcentage de protéine dans l'échantillon ; Alg , le pourcentage d'alginate dans l'échantillon.

2.2.3.3 Influence du pH sur l'allure du diagramme de phases

Le pH joue un rôle déterminant dans les interactions entre protéines et polysaccharides.

Cette étude a donc consisté à voir son influence sur la séparation ségrégative des mélanges de biopolymères alginate de sodium/caséinate de sodium et plus précisément l'impact du pH sur le tracé de la binodale. Selon la méthodologie décrite au paragraphe précédent, le diagramme a été reproduit à pH = 6 et pH = 5,5. Le choix des pH a été décidé en fonction de la stabilité des cellules de LAB qui seront confinées et aussi des agents antimicrobiens produits ($3 < \text{pH} < 8$), et en fonction de l'instabilité des caséinates de sodium ($\text{pH} > \text{pI} = 4,5$). Les solutions mères ont donc été préparées dans des solutions tampon d'imidazole/acide acétique à pH = 6 et pH = 5,5. Des vérifications du pH des mélanges ont été faites avant centrifugation. Enfin, la récupération des phases ainsi que la détermination de leur composition exacte (en caséinate et alginate) ont été effectuées dans les mêmes conditions que précédemment.

2.2.4 Étude du déphasage, analyse de diffusion multiple de la lumière

Lorsque les cellules de LAB ont été ajoutées dans les mélanges polymériques alginate/caséinate, du milieu nutritif MRS_b a été ajouté à la formulation à 20 % (m/m). Le milieu MRS_b contenant des sources protéiques, il s'est avéré être impossible de déterminer un nouveau diagramme de phases. Il manquait une inconnue ne sachant pas si ce milieu se répartit de façon équivalente dans les deux phases. L'analyse au TurbiscanTM (Formulation, France) a permis de pouvoir comparer l'impact de l'ajout de MRS_b sur le déphasage de certaines formulations avec ou sans MRS_b d'un point de vue macroscopique. Les observations microscopiques ont permis d'étudier le phénomène à l'échelle de la microstructure.

2.2.4.1 Principe

Le TurbiscanTM permet d'avoir une empreinte macroscopique d'un échantillon à un temps donné sur sa hauteur permettant de suivre les phénomènes de déphasage (crémage, sédimentation, coalescence et floculation). Une source lumineuse émet un faisceau à 880 nm (diode électroluminescente dans le proche infrarouge) et deux détecteurs reçoivent de façon synchrone : l'un détecte la lumière rétrodiffusée (45° à partir du rayon incident), l'autre détecte la lumière transmise (180° à partir du rayon incident). En mode balayage, la tête de lecture optique balaye toute la longueur de l'échantillon, acquérant des données de transmission et de rétrodiffusion tous les 40 μm .

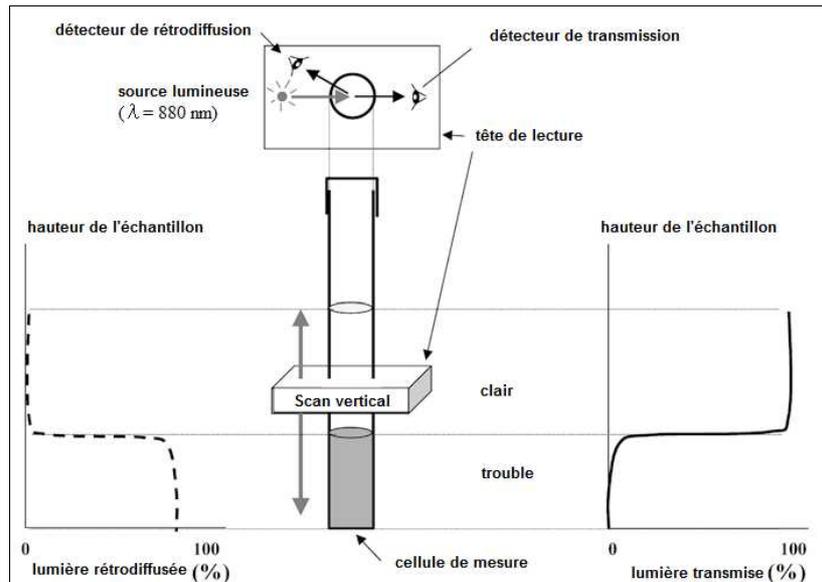


Figure 2.3 Principe de la mesure de diffusion multiple de la lumière avec le Turbiscan™ (Formulation, France) (d'après Chauvierre *et al.*, 2004).

Les instabilités identifiables sont de deux types :

- les migrations de particules : variations locales (en haut et en bas de l'échantillon) de la concentration en particules ;
- les augmentations de tailles : variations globales (sur toute la hauteur de l'échantillon) de la taille des particules.

2.2.4.2 Mesure

A partir des solutions mères d'alginate et de caséinate, différents mélanges de compositions diverses ont été préparés avec ou sans ajout de MRS_b à 20 % (m/m). Après avoir retourné le tube 10 fois, chaque dispersion à analyser a été placée dans une cellule en verre cylindrique. Aussitôt, la cellule a été mise dans l'appareil pour un premier scan. Le suivi du déphasage a été réalisé par des mesures ponctuelles pendant 24h à une température fixe de 25°C. Les courbes fournissent les flux lumineux de transmission et de rétrodiffusion (exprimés en %) en fonction de la hauteur de l'échantillon (en mm).

2.2.5 Mesure du potentiel Zêta des solutions mère d'alginate de sodium et de caséinate de sodium

De la même façon que pour les cellules de LAB, le potentiel Zêta a été déterminé pour les

solutions d'alginate de sodium et de caséinate de sodium afin d'obtenir leurs caractéristiques de charges électriques.

Des solutions tampon imidazole/acide acétique (tampon de faible force ionique permettant de mieux visualiser l'effet du pH sur les polymères) à 5 mmol.L⁻¹ ont été préparées à différents pH : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Le pH a été ajusté avec des solutions de NaOH à 1 mol.L⁻¹ et de HCl à 1 mol.L⁻¹. La solution de caséinate de sodium servant aux mesures a été réalisée à une concentration de 0,001 % (m/m) en diluant dans les différentes solutions tampon une solution mère à 1 % (m/m) réalisée dans de l'eau distillée (avec 0,02 % (m/m) d'azide de sodium). La solution d'alginate de sodium servant aux mesures a été réalisée à une concentration de 0,005 % (m/m) en diluant dans les différentes solutions tampon une solution mère à 1 % (m/m) préparée dans de l'eau distillée (avec 0,02 % (m/m) d'azide de sodium). Les mesures ont été réalisées à l'aide de l'équipement Zeta compact (CAD Instruments, Les-Essarts-le-Roi, France) et acquises à l'aide du logiciel Zeta compact. L'équation de Smoluchowski a été utilisée pour le calcul du potentiel Zêta (Boonaert *et al.*, 2001).

2.3 Préparation des échantillons à tester pour leur activité antimicrobienne

Dans ce paragraphe, sont présentées les protocoles de préparation des différents échantillons testés pour leurs propriétés antimicrobiennes. La **Figure 2.4** ci-dessous présente schématiquement une vue d'ensemble de ces échantillons.

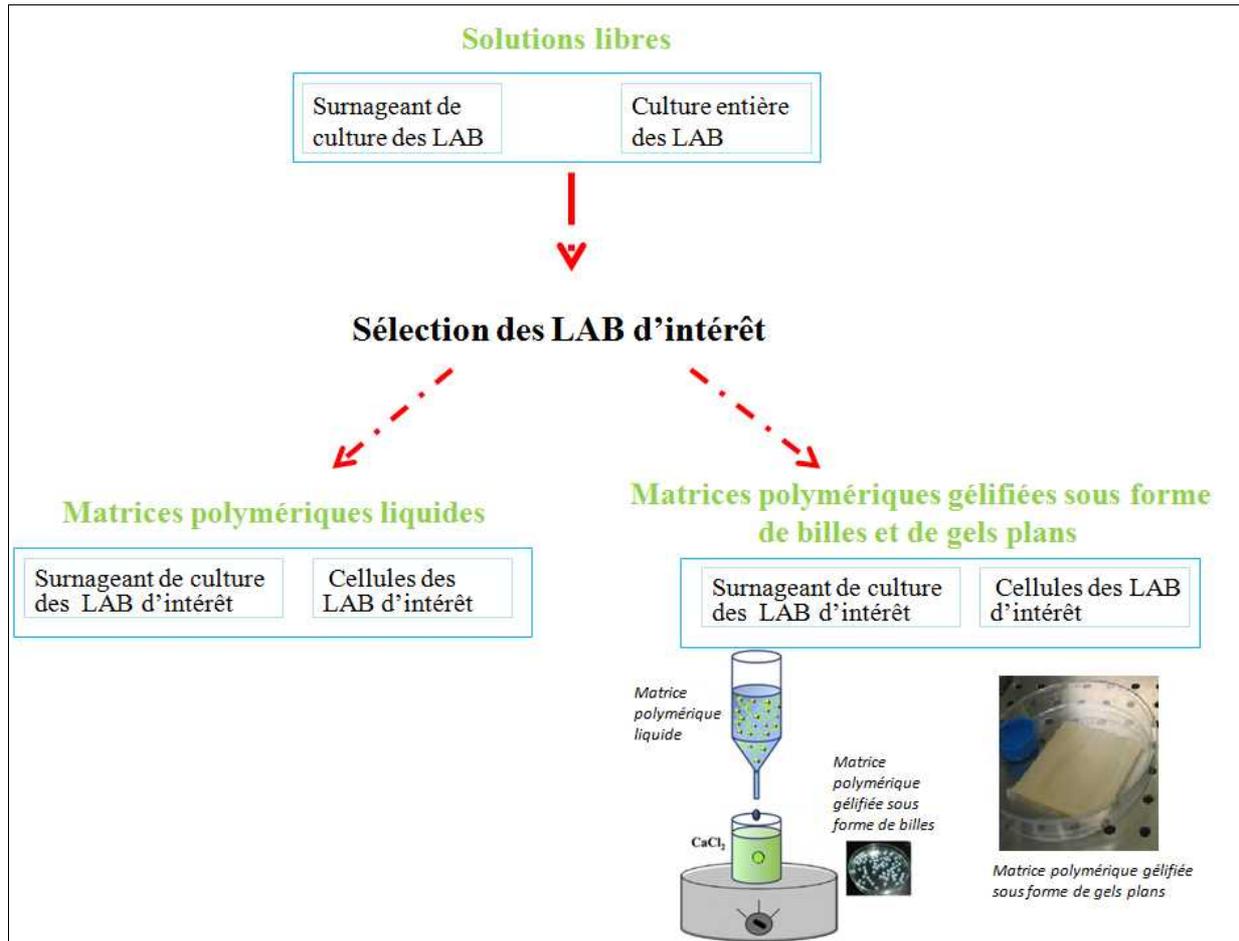


Figure 2.4 Présentation synthétique des différents types d'échantillons testés pour leurs propriétés antimicrobiennes.

2.3.1 Solution de nisine, témoin positif

Pour une grande partie des expérimentations, la nisine a été choisie comme témoin positif du fait de sa nature de bactériocine et de son utilisation dans le domaine de l'agroalimentaire. Une solution mère de nisine à 20 000 Unités Internationales (UI).mL⁻¹ a été préparée à partir de Nisapline (préparation contenant 2,5 % (m/m) de nisine) (Danisco A/S, Copenhague, Danemark) diluée dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,02 mol.L⁻¹. Après agitation pendant 5 minutes, la solution a été conservée à 4°C pendant 14h, centrifugée (5 000 g, 15 min, 4°C) (SIGMA 3K18, Bioblok Scientific) et filtrée (VWR, 0,2 µm).

2.3.2 Préparation des surnageants de cultures bactériennes de LAB

A partir d'un cryotube stock de 1 mL, un tube de 9 mL de MRS_b a étéensemencé pour une

sub-culture de 24h en anaérobiose à la température choisie en fonction des expérimentations (37, 30 ou 20°C). Une pré-culture a été réalisée dans les mêmes conditions d'ensemencement à 10 % (v/v) dans du MRS_b pendant 16h à la même température et toujours en anaérobiose. Pour la culture, la souche a été repiquée à 5 % (v/v) dans du MRS_b stérile et incubée dans les mêmes conditions de température et d'anaérobiose que pour la sub- et pré-culture. A différents temps de la croissance selon les expérimentations (début, milieu et fin de phase exponentielle), les cellules bactériennes ont été éliminées par centrifugation (15 min, 4°C, 5000 g) (SIGMA 3K18, Bioblok Scientific) puis le surnageant a été filtré (VWR, 0,2 µm) et conservé à -20°C pour des utilisations ultérieures. La neutralisation des surnageants avec NaOH à 1 mol.L⁻¹ a été effectuée après décongélation et avant chaque test. Les surnageants neutralisés ont été ensuite stérilisés par filtration (VWR, 0,2 µm).

2.3.3 Préparation des matrices alginate, caséinate et alginate/caséinate

2.3.3.1 Matrices liquides

Les matrices sont préparées à partir de solutions mères d'alginate de sodium et de caséinate de sodium. La solution mère d'alginate de sodium (Alg) (Fisher scientific, Hampton, Hampshire, États-Unis) a été préparée à 4 % (m/m) et la solution de caséinate (Cas) de sodium (Acros organic, Geel, Belgium) à 10 % (m/m) dans l'eau distillée stérile et en condition stérile, puis agitée pendant 14h à température ambiante pour permettre l'hydratation. La solution de caséinate de sodium a ensuite été centrifugée (12 500 g, 15 min, 20°C) (Sigma 3K18, Bioblock Scientific) puis conservée à 4°C. Cette dernière a été traitée thermiquement 10 min à 90°C avant chaque utilisation.

Différents types de matrices ont été testés : alginate, caséinate, alginate/caséinate, alginate/MRS_b, caséinate/MRS_b, alginate-caséinate/MRS_b. Elles ont été préparées pour avoir la composition suivante pour une matrice complète : 1,5 % (m/m) d'alginate, 4 % (m/m) de caséinate, 20 % (m/m) de MRS_b en complétant avec de l'eau distillée stérile.

(ex : Composition d'un échantillon de 2,5 g : 0,9 g de solution mère d'alginate de sodium à 4 % (m/m), 1,0 g de solution mère de caséinate de sodium à 10 % (m/m), 0,5 g de MRS_b, 0,1 g d'eau distillée stérile)

Pour les matrices composées uniquement d'un seul des deux polymères (c'est-à-dire alginate ou caséinate), les pourcentages ci-dessus sont conservés en complétant avec de l'eau distillée stérile.

2.3.3.1.1 Matrices incorporant les surnageants de LAB

Les surnageants des LAB, récupérés après 24h ou récupérés aux trois temps différents (6h, 9h, 24h) de croissance à 30°C en anaérobiose, ont été incorporés dans les différentes matrices suivantes à 20 % en substitution du MRS_b:

- matrice alginate (1,5 % (m/m)) ;
- matrice caséinate (4 % (m/m)) ;
- matrice alginate/caséinate (1,5 % (m/m) d'alginate et 4 % (m/m) de caséinate).

2.3.3.1.2 Matrices incorporant les cellules de LAB

Une pré-culture 1 (PC1) de 24h de la souche de LAB a été réalisée en anaérobiose à 30°C avec un taux d'inoculation de 10 % (v/v), ensuite une culture de 5 % (v/v) à partir de la PC1 a été incubée pendant 16h à 30°C en anaérobiose. Pour récupérer les cellules, 5 mL de la culture ont été prélevés et centrifugés (5 000 g, 15 min, 4°C) (Sigma 3K18, Bioblock Scientific). Le surnageant a été éliminé et le culot a ensuite été repris dans 9 mL de milieu Tryptone Sel (TS) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France). Cette opération a été réalisée deux fois pour laver les cellules de toute trace de milieu de culture. Après la dernière centrifugation, les cellules ont été reprises dans 10 mL de MRS_b ou d'eau distillée stérile (pour les matrices sans MRS_b) pour obtenir deux concentrations finales dans les matrices différentes : C1, à 10⁸ UFC.mL⁻¹ et C2, à 10⁴ UFC.mL⁻¹. La composition testée de la matrice pour l'incorporation des cellules de LAB est la suivante : 1,5 % (m/m) d'alginate, 4 % (m/m) de caséinate.

Tableau 2.5 Exemples de compositions de matrices liquides alginate/MRS_b, caséinate/MRS_b, alginate/caséinate/MRS_b de 2,5 g contenant les cellules de LAB (T, témoin sans cellules).

	Solutions mères					
	Na-alg à 4 % (g)	Na-cas à 10 % (g)	MRS _b (μL)	MRS _b C1 (μL)	MRS _b C2 (μL)	Eau distillée stérile (μL)
T alg/cas	0,9	1	500			100
C1 alg/cas	0,9	1		500		100
C2 alg/cas	0,9	1			500	100
T alg	0,9		500			1100
C1 alg	0,9			500		1100
C2 alg	0,9				500	1100
T cas		1	500			2000
C1 cas		1		500		2000
C2 cas		1			500	2000

2.3.3.2 Matrices gélifiées

Les matrices polymériques d'alginate et d'alginate/caséinate présentées au paragraphe précédent (3.3.1) ont été gélifiées de façon instantanée avec ajout de CaCl₂ (les ions Ca²⁺ servant d'agents gélifiants pour l'alginate) soit sous forme de billes soit sous forme de gels plans.

Le MRS_b classique a été remplacé par du MRS_m_b (MRS modifié sans phosphate et sans acétate pour une meilleure gélification).

2.3.3.2.1 Gélification sous forme de billes

La gélification sous forme de billes a été réalisée en utilisant soit une seringue stérile avec une aiguille stérile (18G 1 1/2, Terumo, Etats-Unis), soit l'unité d'encapsulation Nisco Encapsulation Unit VarV1 LIN-0119 (Nisco Engineering AG, Zurich, Suisse).

Avec l'unité Nisco, les paramètres utilisés pour réaliser les billes ont été les suivantes :

- taux de vibration : 5 kV,
- hauteur de chute 6 cm,
- débit 100 mL.h⁻¹,
- buse de 1,1 mm,
- concentration en CaCl₂ à la sortie du circuit de 0,1 mol.L⁻¹ (10 mL dans une boîte de Pétri de diamètre 55 mm).

Ces paramètres ont été choisis pour obtenir des billes de diamètre compris entre 1,5 et 2 mm.

Pour travailler en zone stérile, l'appareil a été utilisé sous une hotte à flux laminaire, laissé préalablement sous UV 15 min. Le circuit a été nettoyé à l'alcool à 70° puis rincé à l'eau distillée stérile entre chaque série d'expérience. Entre chaque échantillon passé, le circuit est rincé avec environ 10 mL d'eau distillée stérile.

Après 15 min dans la solution de calcium, les billes ont été rincées : la solution de calcium est remplacée par 10 mL d'eau distillée stérile.

Pour les tests antimicrobiens, les billes ont été déposées 1 à 1 (3 répétitions) sur la gélose inoculée avec la souche cible (cf : 2.5.2).

2.3.3.2.2 *Gélification sous forme de gels plans*

Une plaque d'acier de 10 cm par 10 cm a été recouverte d'un papier Benchguard (face plastifiée vers le haut). Des rebords de 0,8, 0,9 et 1 mm (code 80-90-100 du set du laboratoire BioDyMIA) ont été empilés et ont été fixés autour de la plaque (**Figure 2.5**, étape (i)). Une quantité de 20 mL de solution matricielle (présentée au paragraphe 3.3.1) a été coulée au centre et répartie sur toute la surface. Un papier Benchguard imbibé de CaCl_2 (1 mol.L⁻¹) a été placé par-dessus (face plastifiée vers le haut) (**Figure 2.5**, étape (ii)), puis une seconde plaque d'acier de même dimension est venue fermer le système (**Figure 2.5**, étape (iii)). Le temps de contact avec le papier imbibé de solution de CaCl_2 a été fixé à 30 min.



Figure 2.5 Illustration du protocole de fabrication de gel plan d'alginate et d'alginate-caséinate.

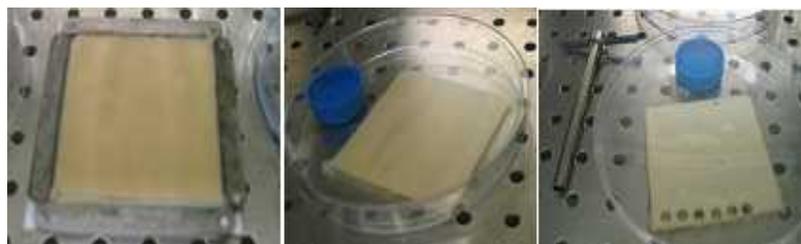


Figure 2.6 Exemple d'un gel d'alginate 1,5 % (m/m), caséinate 4 % (m/m) et 20 % (m/m) MRS_m.

Pour les tests de cultivabilité (cf : 2.5.1) des cellules de LAB (gels avec cellules de LAB) et les tests antimicrobiens, des disques, respectivement, de 6 mm et 8 mm de diamètre ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce. Pour les tests antimicrobiens, les disques ont été déposés (3 répétitions) sur la gélose inoculée avec la souche cible (cf : 2.5.2).

2.4 Tests antimicrobiens pour l'évaluation des capacités bioprotectrices des différentes souches de LAB (solutions libres et matrices polymériques (liquides et gélifiées))

Dans la majorité des cas, le test en milieu gélosé a été privilégié. En effet, dans le contexte de l'étude, la biopréservation, le milieu gélosé mime une surface contaminée.

2.4.1 Méthode de diffusion en puits en milieu gélosé, échantillons liquides

Ce test a été utilisé pour les échantillons liquides (surnageants, cultures entières de LAB, matrices polymériques liquides).

Les souches cibles, *L. innocua* LRGIA01, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* S162, ont été cultivées, à partir des pré-cultures définies au paragraphe 1.2, dans du TSB (10 % v/v) jusqu'en début de phase exponentielle (environ 4-5h après l'inoculation), obtenant ainsi une densité cellulaire à 10^8 UFC.mL⁻¹. A partir de cette culture pour les souches de *Listeria* et de la pré-culture 2 (voir paragraphe 1.2) pour *K. rhizophila* ATCC 9341, le milieu gélosé approprié, gélose « Tryptone Soja Agar » (TSA) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France), a été inoculé en masse à raison de 5 % (v/v) pour *L. innocua* LRGIA01 et ATCC 33090, et de 1 % pour *L. monocytogenes* S162 et *K. rhizophila* ATCC 9341 pour obtenir une inoculation du milieu gélosé à environ 10^7 UFC.mL⁻¹. Une quantité de 50 mL de cette gélose a été coulée dans des boîtes de Petri (de diamètre 140 mm). Après repos de la gélose à 4°C pendant 30 min, des puits de 6 mm ont été réalisés stérilement dans cette gélose et remplis avec 40 µL d'échantillon liquide. Pour chacun des échantillons, trois puits ont été remplis. Ces boîtes de Petri ont été placées à une température de 4°C pendant 3h pour permettre une meilleure diffusion des substances antimicrobiennes. Elles ont ensuite été mises dans les conditions de culture optimale de croissance des souches de *Listeria* : 30°C pendant 24h (de même pour *K. rhizophila* ATCC 9341). La lecture a été faite par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour de chaque puits. Cette dernière a été effectuée à l'aide d'un pied à

coulisse (Mitutoyo, $\pm 0,02$ mm). Le diamètre a été calculé selon la formule suivante :

Z_i (mm) = Diamètre de la zone d'inhibition (mm) – Diamètre des puits (6 mm).

Une moyenne sur les trois puits a été réalisée.

2.4.2 Méthode de diffusion entre deux couches de milieu gélosé, échantillons gélifiés

Les échantillons gélifiés (matrices gélifiées sous forme de billes ou de gels plans découpés en pastille) ont été déposés entre deux couches de gélose TSA (pour une boîte de diamètre 140 mm : couche inférieure de 30 mL et couche supérieure de 20 mL) pré-inoculée en masse à 5 % (v/v) pour *L. innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 et 1 % pour *L. monocytogenes* S162 et *K. rhizophila* ATCC 9341 comme décrit au paragraphe précédent. La première couche a été coulée, et après un repos de la gélose 30 min à 4°C, les dépôts ont été faits et la deuxième couche a été répartie. Pour chacun des échantillons, trois dépôts ont été réalisés. Ces boîtes ont été mises à 4°C pendant 3h pour permettre une meilleure diffusion des substances antimicrobiennes. Elles ont ensuite été mises dans les conditions de culture optimale de croissance des souches de *Listeria* : 30°C pendant 24h (de même pour *K. rhizophila* ATCC 9341). La lecture a été faite par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour des billes ou des pastilles de gel. Cette dernière a été réalisée à l'aide d'un pied à coulisse (Mitutoyo, $\pm 0,02$ mm).

Le calcul du diamètre a été effectué selon la formule suivante :

Z_i (mm) = Diamètre de la zone d'inhibition (mm) – Diamètre des billes ou pastilles de gel (mm).

Une moyenne sur les trois dépôts a été réalisée.

2.5 Confinement des cellules de LAB dans les matrices polymériques pour une production *in situ* des métabolites anti-*Listeria*

Les cellules de LAB ont été incorporées dans les matrices polymériques comme décrit aux paragraphes 2.3.3.1.2 (matrices liquides) et 2.3.3.2 (matrices gélifiées sous forme de billes ou de gels plans). Après échantillonnage, le stockage a été réalisé à 30°C et/ou à 4°C pour suivre l'activité antimicrobienne de tels systèmes et la viabilité des cellules de LAB.

2.5.1 Suivi de la viabilité par dénombrement

Un dénombrement des échantillons liquides et sous forme de billes a été effectué pour suivre l'évolution de la population de LAB. Pour cela, des dilutions décimales de chaque échantillons ont été effectuées et 1 mL de trois dilutions successives a été ensemencé en masse dans du milieu MRS_g. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 heures dans des jarres d'anaérobiose en utilisant l'Anaérocult A (Biomérieux, France). Pour les échantillons liquides, le nombre UFC par mL d'échantillon a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{d_1 * V * (n_1 + (0,1 * n_2))}$$

N : Nombre d'unité formant colonie par mL dans la culture initiale (en UFC.mL⁻¹)

Σ C : Colonies comptées sur l'ensemble des boîtes retenues

d₁ : Valeur de la dilution la moins grande retenue

V : volume déposé (en mL)

n₁ : nombre de boîtes retenues à la d₁

n₂ : nombre de boîtes retenues à la d₂ (valeur de la dilution la plus forte retenue).

Pour les échantillons sous forme de billes, une étape de solubilisation préalable est nécessaire. Une bille a été placée dans 2,5 mL de tampon phosphate à 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7, et laissée au moins 3h à température ambiante après avoir été vortexée.

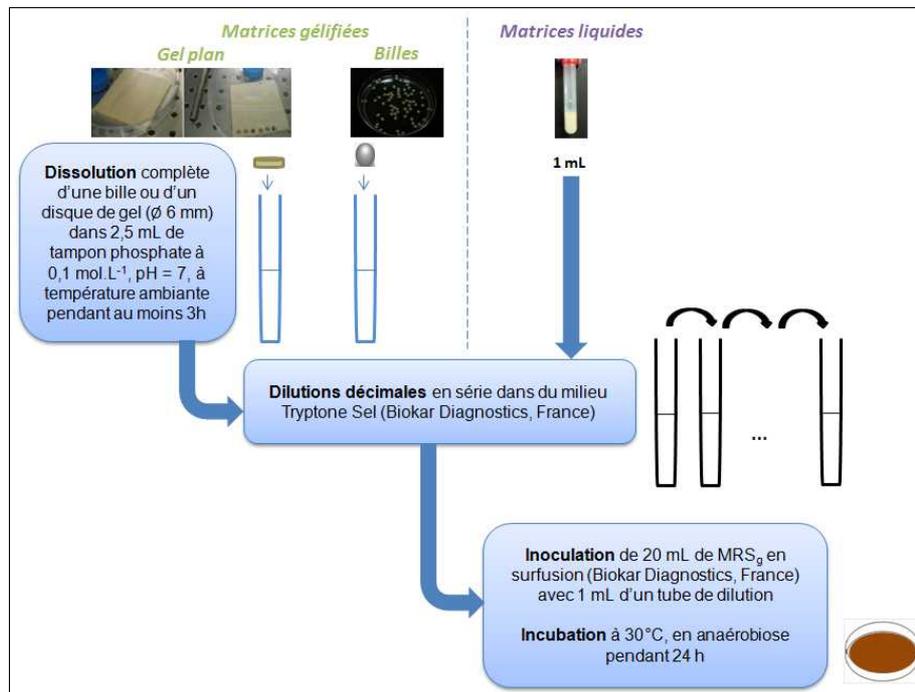


Figure 2.7 Suivi de la viabilité par mesure de la cultivabilité des cellules de LAB confinées dans les matrices biopolymériques liquides et gélifiées.

Ce suivi de viabilité a été répété pendant douze jours à intervalle régulier : J0, J1, J5, J8, J12.

En parallèle du dénombrement des cellules cultivables de LAB sur milieu gélosé MRS, un dénombrement a aussi été réalisé au microscope après coloration des cellules avec le kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, France) (voir 2.6). Cela a permis de comparer deux méthodes de dénombrements et d'étudier aussi la localisation des cellules dans les matrices polymériques au cours du temps.

2.5.2 Tests antimicrobiens pour l'évaluation des capacités bioprotectrices des cellules de LAB incorporées dans les matrices polymériques liquides et gélifiées

Les tests d'inhibition concernant les échantillons gélifiés sous forme de billes et de gels plans ont été réalisés selon la méthode de diffusion entre deux couches de gélose décrite au paragraphe 2.4.2. Pour les mélanges liquides, les tests ont été faits selon la méthode de diffusion en puits décrite au paragraphe 2.4.1. Ce suivi de l'activité antimicrobienne a été répété pendant douze jours à intervalle régulier : J0, J1, J5, J8, J12.

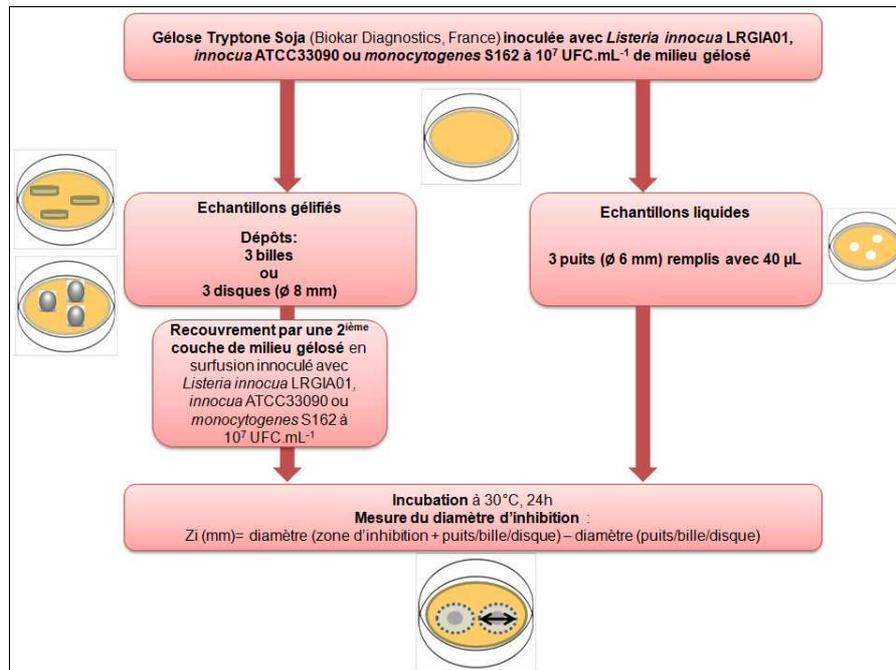


Figure 2.8 Suivi de l'activité anti-*Listeria* des cultures de LAB confinées dans des matrices gélifiées et non gélifiées d'alginate et d'alginate/caséinate.

2.6 Étude microscopique

2.6.1 Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

2.6.1.1 Principe

Avec un microscope conventionnel, la lumière de toutes les zones de l'objet, pas seulement de la zone de mise au point, entre dans le microscope et est utilisée pour créer une image brouillée et confuse. Par le développement du Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL), ce problème a été résolu. Le microscope confocal permet une meilleure résolution axiale grâce à la présence d'un trou de filtrage (pinhole, diaphragme) adapté qui permet d'éliminer la lumière émise par les plans sous- et sur-jacents au plan de focalisation.

La lumière à l'excitation (laser) est une source ponctuelle. Sur la **Figure 2.9**, le point source de lumière, l'échantillon et le détecteur sont en confocalité. La lumière provenant de l'échantillon mais provenant de plans situés au-dessus et au-dessous du plan focal est éliminée par le pinhole (diaphragme) de sortie.

L'obtention d'une image d'un plan focal en x et y est réalisée par un système de balayage spatial à

l'aide de deux miroirs. L'image obtenue est une véritable coupe optique de l'intérieur de l'échantillon.

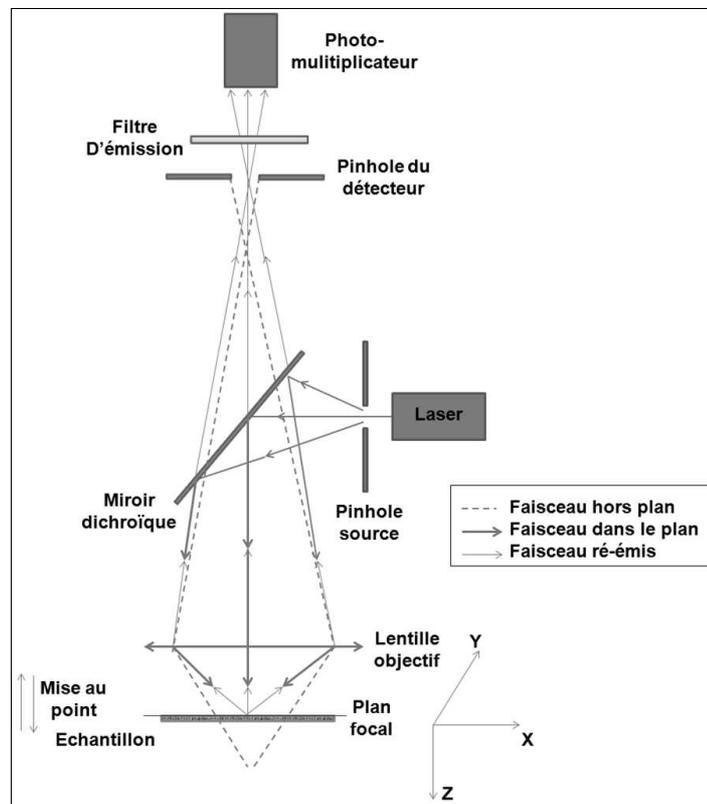


Figure 2.9 Principe de fonctionnement d'un MCBL (d'après Paddock, 2000).

2.6.1.2 Marquage des caséinates

Les caséinates ont été marquées de manière non-covalente et non-spécifique avec une solution de Rhodamine B Isothiocyanate (RITC) (R1755, Sigma-Aldrich, Allemagne). La RITC se fixe aux protéines via des interactions hydrophobes. Sa longueur d'onde d'émission est de 543 nm et sa longueur d'onde d'excitation est une bande passante comprise entre 560 et 590 nm.

Une solution de RITC a été préparée à une concentration de 1 mg.mL^{-1} dans de l'eau distillée et protégée de la lumière. Pour le marquage des caséinates, cette solution est ajoutée à 0,1 % (m/m) à la solution mère de caséinate à 10 % (m/m). Cette nouvelle solution a été agitée une heure à l'obscurité. Cette étape s'est faite en amont de la formulation des mélanges polymériques avec alginate et les cellules de LAB.

2.6.1.3 Marquage des cellules de LAB

À J0, pour 1 mL de suspension cellulaire à 5.10^8 UFC.mL⁻¹ avant ajout aux matrices polymériques liquides (voir paragraphe 2.3.3.1.2), les fluorochromes du kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, France) ont été ajoutés (1 µL de Syto 9 + 2 µL d'iodure de propidium (IP)). La suspension a été vortexée pendant 10 s. Pour les matrices gélifiées, la gélification a été réalisée une fois que les cellules aient été marquées et incorporées dans les matrices polymériques.

Ce kit a été utilisé dans le but de suivre l'état physiologique au cours du temps des cellules de LAB incorporées dans les matrices polymériques et également de les localiser dans ces systèmes. Le kit est composé de deux marqueurs ayant pour cible les acides nucléiques : le Syto 9 et l'IP. Si la membrane plasmique est endommagée, les deux marqueurs pénètrent dans la cellule et se fixent au niveau des acides nucléiques pour donner une coloration rouge. A l'inverse, si la membrane est intacte, seul le Syto 9 pénètre dans la cellule et la colore en vert. Il est donc possible de différencier les cellules viables colorées en vert et les cellules non viables colorées en rouge. Pour le Syto 9, la longueur d'onde d'émission est de 530 nm et la longueur d'onde d'excitation est de 504 nm. Pour l'IP, la longueur d'onde d'émission est de 615 nm et la longueur d'onde d'excitation est une bande passante comprise entre 530 et 585 nm.

Les longueurs d'onde d'excitation de l'IP et de la RITC se chevauchant, il n'a pas été possible de faire le triple marquage (Syto 9, IP et RITC). Donc, dans un premier temps, la structure du mélange (phase continue, phase dispersée) a été identifiée sur un échantillon avec les cellules non marquées et les caséinates marquées à la RITC puis, la viabilité et la localisation des cellules ont été étudiées sur un échantillon avec les cellules marquées et les caséinates non marquées.

2.6.1.4 Préparation des échantillons gélifiés

Les billes préparées comme indiquées au paragraphe 2.3.3.2.1 (avec les solutions mères marquées) ont été fixées dans une solution fixatrice avec 2 % (m/v) de para formaldéhyde à 0,1 mol.L⁻¹ de cacodylate, 10 mmol.L⁻¹ CaCl₂ et 2% (m/v) de saccharose. Pour faire pénétrer le fixateur dans les billes, elles ont été laissées sous vide 15 min. Après avoir renouveler la solution fixatrice, elles ont été laissées 1h sous atmosphère normale et à température ambiante. Ensuite, elles ont été rincées à deux reprises à l'aide d'une solution de rinçage à base de tampon cacodylate à 0.1 mol.L⁻¹ , CaCl₂ à 10 mmol.L⁻¹ et saccharose à 2% (m/v). Les billes ont été mises dans des moules en présence d'OCT colorée (Optical Coherence Tomography) (TFM, Tissue Freezing

Medium, Triangle Biomedical, Durham) et ont été congelées dans l'iso-pentane à -65°C puis, ont été stockées dans le congélateur à -80°C .

Des coupes de $10\ \mu\text{m}$ ont été réalisées à l'aide d'un microtome « Microtome de cryostat Reichert Cryocut 1800, leica microsysteme CM 1800 » (Température du porte objet : -25°C ; Température de l'enceinte -18°C).

2.6.1.5 Observations

Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal à balayage laser Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, Allemagne).

Etude de la microstructure dans le temps pour des matrices polymériques liquides

Les mélanges de caséinate (marquée avec la RITC) avec l'alginate avec ou sans MRS_b ont été préparés comme décrit au paragraphe 2.3.3.1. Immédiatement après agitation, un volume de $20\ \mu\text{L}$ a été prélevé à l'aide d'une micropipette et déposé sur une lame de microscope recouverte ensuite par une lamelle. L'évolution des microstructures a été observée pendant 30 min avec une prise d'image toutes les 5 à 10 min. Ces images ont été traitées à l'aide du logiciel Image J (version 1.43u, National Institutes of Health, Etats-Unis).

Suivi de la viabilité dans le temps des cellules incorporées dans les matrices liquides

Pour stabiliser les émulsions lors des observations, $10\ \mu\text{L}$ des mélanges polymériques ont été déposés sur une lame précédemment préparées comme suit.

Les lames ont été préalablement recouvertes d'une solution bouillie d'agar à 2 % (m/m) à $1\ \text{mmol.L}^{-1}$ de CaCl_2 et laissées à température ambiante sur la paillasse au moins une nuit pour séchage.

Le dépôt a ensuite été recouvert d'une lamelle.

2.6.1.6 Traitements des images

Pour déterminer le nombre de cellules viables et non viables au cours du temps, un traitement d'image a été nécessaire avec le logiciel Volocity[®]6.2.1 (PerkinElmer, Etats-Unis) avec lequel un protocole a été mis au point pour déterminer les cellules viables dans la phase protéique séparément de celles dans la phase alginate, de même pour les cellules non viables.

Le calcul du nombre de cellules.mL⁻¹ à partir du comptage des cellules sur les images a été réalisé selon les calculs suivants :

$$S(\text{image}) = 75 \times 75 \mu\text{m}^2 = 0,005625 \text{ mm}^2$$

Or les 10 μL se répartissent sur la lame sur $86,5 \text{ mm}^2$,

Donc 10 μL représentent 15 393,78 champs,

Donc 1 mL représente 1 539 378 champs.

$$\text{Nb cellules/mL} = \text{Nb de cellules sur un champs} * 1\,539\,378 * 5$$

avec 5 le nombre estimé de champs superposés (l'épaisseur de l'échantillon est estimé à 115 μm , mesure prise en repérant le fond et le haut de l'échantillon sur lame à l'aide du microscope (position en z)).

2.6.2 Microscopie Électronique à Balayage (MEB)

2.6.2.1 Principe

La Microscopie Électronique à Balayage (MEB) permet d'obtenir une topographie de la surface d'un objet avec une résolution nanométrique. Le principe repose sur l'interaction d'un faisceau d'électrons très fin (0,5 – 50 nm) et monocinétique avec la matière. Les échantillons doivent au préalable être déshydratés et métalliser afin d'obtenir une couche conductrice pour les électrons. Le principe de la microscopie électronique repose sur l'interaction d'un faisceau monocinétique d'électrons focalisé sur l'échantillon sur un diamètre très faible (~10 nm dans le cas du MEB utilisé dans ce travail, de l'ordre de 0,1 nm sur les MEB les plus sophistiqués). L'interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon se traduit par des collisions multiples avec les atomes de la cible qui génèrent différents processus : émission de rayons X, d'électrons Auger, d'électrons secondaires. Dans le cadre de ce travail, les images ont été réalisées en s'intéressant uniquement à l'émission d'électrons secondaires : un électron incident (ou rétrodiffusé) éjecte par collision un électron d'un atome de la cible (**Figure 2.10**). Ces électrons secondaires de faible énergie cinétique (quelques dizaine d'électron-volts) sont donc émis près de la surface de l'échantillon (à une profondeur comprise entre 5 et 10 nm) et sont sensibles à sa topographie.

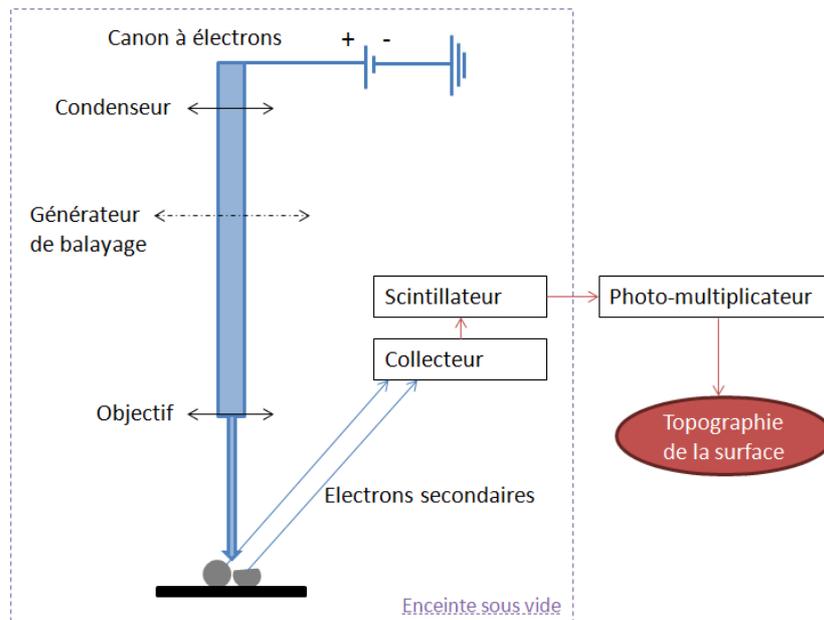


Figure 2.10 Principe de fonctionnement d'un Microscopie Électronique à Balayage.

2.6.2.2 Préparation des échantillons et observations

Les billes d'alg et d'alg/cas ont subi une pré-déshydratation en les plongeant 10 min dans des bains successifs d'éthanol à 30, 50 et 70 %. Puis elles ont été laissées une nuit dans le dernier bain à 70 % d'éthanol. Elles ont été ensuite déshydratées suivant la méthode du point critique du CO₂. Les échantillons pré-déshydratés ont été transférés dans l'appareil (Critical Point Dryer 030, Bal-tec, Balzers, Liechtenstein) et la température de l'enceinte a été abaissée. Le CO₂ liquide à 8°C est miscible à l'éthanol qui imprègne le milieu. L'éthanol est progressivement remplacé par le CO₂ liquide et la préparation est amenée au point critique du CO₂ (T = 31°C, P = 73,8 bars). Ces valeurs sont dépassées. La préparation est ensuite ramenée très progressivement aux valeurs de température et de pression ambiantes évacuant le gazeux. La préparation est ainsi desséchée sans altération du volume, ce qui permet une dessiccation en minimisant les déformations.

La surface des billes et certaines sections ont été ensuite métallisées recouvertes par une fine couche d'or (25 à 30 nm) (Métallisateur à pulvérisation cathodique, Cressington Série 108, Eloïse, Roissy, France).

Les observations ont été réalisées avec le microscope MEB FEI ESEM-XL30 (Hillsboro, Oregon, Etats-Unis). Le canon d'électrons a été soumis à une tension d'accélération de 14,0 kV.

2.7 Caractérisation des métabolites antimicrobiens responsables de l'activité bioprotectrice

Ce paragraphe présente les méthodes et protocoles utilisés pour identifier la nature des métabolites produits par les LAB et responsables de leur activité antimicrobienne.

2.7.1 Neutralisation, traitements enzymatiques et thermiques des surnageants

Les différents traitements réalisés permettent de déterminer si :

- l'activité bioprotective est due à la production d'acides organiques entraînant une acidification du milieu (néfaste pour certaines souches cibles),
- l'activité antimicrobienne est plutôt due à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène dans le milieu (puisque les LAB sont dépourvues de catalase),
- l'activité est de nature protéique (activité disparaissant après action d'enzymes protéolytiques sur les surnageants testés),
- l'activité est due à des métabolites thermostables, thermorésistants.

Neutralisation

Afin d'éliminer l'effet antimicrobien lié au pH acide (environ 4 pour un surnageant de LAB en fin de culture), le pH des surnageants a été ajusté au pH du milieu MRS_b (pH = 6,0 après autoclave) en utilisant de la soude (NaOH) à 1 mol.L⁻¹ avant d'être à nouveau filtrés (WWR, 0,2 µm).

Traitement à la catalase

Les surnageants filtrés/neutralisés/filtrés ont été incubés en présence de catalase (C30, Sigma-Aldrich) (préparée dans une solution tampon phosphate à 50 mmol.L⁻¹ à pH = 7) à une concentration finale de 300 UI(Unité Internationale).mL⁻¹ pendant une heure au bain thermostaté à 37°C. La réaction a été arrêtée par une incubation à 65°C pendant 10 min.

Traitement aux enzymes protéolytiques

Les surnageants filtrés/neutralisés/filtrés ont été traités avec différentes enzymes protéolytiques à une concentration finale de 1 mg.mL⁻¹. Les enzymes testées ont été la protéase P6110 d'*Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich), la trypsine T4799 de pancréas porcin (Sigma-Aldrich) et l' α -chymotrypsine

C4129 de pancréas bovin (Sigma-Aldrich) (préparées dans une solution tampon Tris-HCl à 1 mol.L⁻¹ à pH = 7,6). Les surnageants ont été incubés avec ces différentes solutions enzymatiques au bain thermostaté à 37°C pendant 3h. Les réactions ont été arrêtées par une incubation à 65°C pendant 10 min.

Traitements thermiques

Les différents traitements thermiques subis par les surnageants filtrés/neutralisés/filtrés ont été réalisés en bain thermostaté à 40, 65, et 100°C pendant une heure.

Ces surnageants pré-traités ont ensuite été testés selon la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé (2.4.1).

2.7.2 Dosage de l'acide lactique

L'acide lactique est l'acide majoritaire produit par les LAB. Le dosage de l'acide lactique a été utilisé pour permettre d'identifier et de quantifier et cette production au mieux pour une souche donnée. Ce dosage a été réalisé en utilisant le kit Megazyme D-lactic acid and L-lactic acid (K-DLATE) (Fournisseur Libios, France). Les réactions mises en œuvre lors de ce dosage sont des réactions enzymatiques (Principe, procédure et présentation des calculs en annexe 2). L'acide D-lactique et l'acide L-lactique sont dosés successivement. Les concentrations en acides lactiques (D et L) sont exprimées en g.L⁻¹ d'échantillon.

2.7.3 Purification partielle de « BLS » (« Bacteriocin Like Substance »)

Pour comprendre au mieux les mécanismes responsables de l'activité antimicrobienne mis en œuvre par les souches de LAB, il est important de caractériser les agents produits. D'après la méthode de Jiang *et al.*, 2012, une purification partielle des composés peptidiques présents dans le surnageant de culture des LAB en fin de phase stationnaire a été réalisée : récupération du surnageant, précipitation au sulfate d'ammonium, concentration et chromatographie d'exclusion stérique. Par la suite, les fractions obtenues ayant une capacité antimicrobienne ont été analysées par électrophorèse Tricine-Page.

2.7.3.1 Purification partielle de « BLS »

Culture et récupération du surnageant

Une sub-culture de 10 mL de LAB3 a été réalisée dans MRS_b pendant 24h à 30°C en anaérobiose à partir d'un mL d'un cryotube stocké à -20°C. Un schott de 200 mL de MRS_b a ensuite été inoculé à 5 % (v/v) et incubé pendant 24h à 30°C en anaérobiose pour une pré-culture. Une culture de 2 L dans du MRS_b (inoculée à 5 % (v/v) à partir de la pré-culture) a été incubée pendant 24h à 30°C en anaérobiose. Le surnageant a été récupéré par une centrifugation à 4 000 g, 10 min, à 4°C puis filtré sur membrane 0,2 µm (VWR) et conservé par congélation à -20°C.

Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium

Après décongélation, les protéines présentes dans le surnageant natif ont été précipitées en présence d'une solution de sulfate d'ammonium (Réf 24071, Chimie-Plus Laboratoires, France) saturée à 80 % (v/v) et le mélange (surnageant/solution de sulfate d'ammonium) a été mis à agiter vigoureusement à 4°C pendant 2h. La précipitation s'est poursuivie pendant 14h à 4°C sans agitation. Pour récupérer le précipité, une centrifugation a été réalisée à 9 000 g, 4°C pendant 45 min. Le précipité a ensuite été suspendu dans 100 mL d'eau ultra pure.

Pour éliminer le sulfate d'ammonium, une dialyse sur membrane de seuil de coupure de 500 Da (cellulose ester, MWCO 100-500 Da, diamètre 20 mm, Spectra/Por Biotech, Spectrum Labs, États-Unis) a été réalisée pendant 48h à 4°C. L'échantillon, d'un volume de 400 mL après la dialyse, a ensuite été lyophilisé (Lyophilisateur Epsilon 2-4, Bioblock, Illkirch, France) pendant environ 5 jours et conservé au congélateur à -20°C. Une quantité de 2 g a ainsi été récupérée.

Chromatographie d'exclusion stérique

Pour séparer les protéines/peptides selon leurs poids moléculaires, une chromatographie d'exclusion stérique (appelée aussi filtration sur gel ou tamisage moléculaire ou chromatographie de perméation) a été utilisée. Par cette technique, des macromolécules en mélange sont véhiculées par un tampon d'élution à débit fixé (phase mobile) et séparées selon leur taille dans une colonne contenant des billes de polymère de porosité variable (phase stationnaire). Les molécules de taille supérieure à celle des pores des billes sont exclues du gel et ne se répartissent que dans le volume correspondant à la phase mobile. Elles sortent les premières à un volume d'élution appelé volume mort de la colonne. Les molécules de taille inférieure à celle des pores des billes peuvent pénétrer librement dans les billes et se répartissent dans l'ensemble des liquides de la colonne (phase

stationnaire et éluant). Elles sortent donc les dernières à un volume d'éluion qui est le volume total des liquides de la colonne. Les molécules de tailles intermédiaires pénètrent dans les billes en fonction de leur taille et de leur forme. Elles pénètrent d'autant moins qu'elles sont plus grosses et elles sont éluées dans l'ordre des masses molaires décroissantes.

Un gramme du surnageant de culture précipité au sulfate d'ammonium, dialysé, lyophilisé, a été repris dans 5 mL d'eau ultra pure et déposé sur une colonne de gel Sephadex G25 (G2580, Sigma Aldrich, Allemagne) de diamètre de 1,6 cm et de 100 cm de hauteur, équilibrée dans de l'eau ultra-pure. Le gel Sephadex G25 a été choisi d'après son domaine de fractionnement qui est 1000-5000 Da. Celui-ci définit la gamme des masses molaires pour lesquelles il y a diffusion partielle ou totale. La masse molaire de la molécule d'intérêt que nous cherchions à purifier, était englobée dans cette gamme.

Le débit a été réglé à 0,5 mL.min⁻¹ et l'échantillon a été élué avec de l'eau ultra pure. Cent cinquante fractions de 1 mL ont été récupérées et la DO a été mesurée à 280 nm (détection de l'absorbance due aux acides aminés aromatiques) et 215 nm pour tracer un chromatogramme. Selon les pics obtenus, les fractions ont été réunies en 6 pools (pool 1, 2, 3, 4, 5, 6) testés pour leur activité anti-*Listeria* et caractériser par électrophorèse Tricine-Page.

2.7.3.2 Analyse électrophorétique : Tricine-Page

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS Tris-tricine est une méthode de séparation des peptides et des protéines en fonction de leurs masses moléculaires. Les protéines sont des molécules amphiphiles qui portent des charges positives et négatives localisées sur les chaînes latérales des acides aminés. Elles adoptent des structures tridimensionnelles caractéristiques et certaines charges peuvent être exposées à la surface de la molécule, comme elles peuvent être enfouies au cœur de la molécule. L'électrophorèse va donc s'effectuer sur des protéines dénaturées, c'est-à-dire ayant perdu leurs structures tertiaires et secondaires. Un détergent de type anionique recouvre les chaînes polymériques dénaturées en leur conférant une charge. Les différentes protéines d'un mélange complexe se trouvent donc recouvertes de charges négatives. Lorsqu'une tension continue est appliquée entre les extrémités d'un gel où a été déposé le mélange complexe de protéines, les protéines migrent au travers des mailles constituant le gel. Les mailles du gel retiendront moins les petites molécules qui auront alors la migration la plus grande. Les molécules les plus longues seront d'autant plus retenues entre les mailles du gel et auront une migration

relative plus faible. Une fois la migration terminée, différents procédés sont utilisés pour la révélation. La plus courante consiste en une coloration spécifique des protéines. Le gel est coloré et il fait apparaître un profil électrophorétique qui met en évidence des bandes dont l'intensité correspond partiellement à l'abondance dans le mélange et dont la position reflète la masse moléculaire relative. Cette masse moléculaire est comparée à des étalons commerciaux calibrés en unité de masse protéique (Dalton).

L'électrophorèse Tricine-page est communément utilisée pour la séparation des peptides de masse moléculaire allant de 1 à 100 kDa nous permettant pour ce projet de détecter la présence de bactériocines dans les surnageants de culture de LAB. Ce protocole a été mis au point au sein du laboratoire BioDyMIA à partir de deux publications de Schägger (Schägger et Von Jagow, 1987 ; Schägger, 2006).

Le protocole détaillé est présenté en annexe 3. Un marqueur de poids moléculaires (marqueur Ultra-low M3546, Sigma) a été déposé sur le gel pour avoir une échelle de poids moléculaires (de 1,1 kDa à 26,6 kDa) permettant de déterminer les masses moléculaires des bandes obtenues pour les dépôts échantillons. Le marqueur et les échantillons ont été ajoutés au tampon de charge deux fois concentré (1 % (m/v) de Docétyl Sulfate de Sodium (SDS), Tris à 0,1 mol.L⁻¹, 24 % (m/v) de glycérol, 4 % (v/v) de mercaptoéthanol, 0,02 % (m/v) de Serva Blue® (Serva, GmbH, Allemagne), pH = 6,8) en proportion 50/50 (v/v). Le gel de séparation sur 14 cm (à 16,5 % (m/v) de T, 6 % (m/v) de C) (avec T, la concentration totale en acrylamide/bis-acrylamide et C, la concentration en bis-acrylamide) est surmonté par un gel d'espacement sur 2 cm (à 10 % (m/v) de T, 3 % (m/v) de C) puis par un gel de concentration sur 4 cm (à 4 % (m/v) de T, 3 % (m/v) de C). Les volumes des dépôts dans les puits ont été de 10 µL. La migration a été réalisée dans un tampon anode (Tris à 0,2 mol.L⁻¹, pH = 8,9) et un tampon cathode (0,1 % (m/v) de SDS, Tris à 0,1 mol.L⁻¹, Tricine à 0,1 mol.L⁻¹, pH = 8,25) selon le programme suivant (pour deux gels) (générateur Bio-Rad, Power Pac™, Universal, 500 V, 2,5 A, 500 W) :

- Étape 1 : 30 V, limites 100 mA/500 W, durée 1h
- Étape 2 : 7 W, limites 300 V/250 mA, durée environ 18h.

A la fin de la migration, le gel a été récupéré délicatement et révélé. Une première étape de pré-fixation a été réalisée avec un bain d'une heure dans une solution de glutaraldéhyde (G6257, Sigma) à 5 % (v/v). Le gel a ensuite été rincé dans l'eau distillée et placé dans un bain avec la solution de fixation (acide acétique (33209, Sigma)/méthanol (65543, Sigma)/eau distillée (10/50/40) (v/v/v)) pendant 30 min. Puis le gel a été coloré 1h dans une solution de Serva Blue®

(Serva, GmbH, Allemagne) à 0,025 % (m/v) dans de l'acide acétique à 10 % (v/v) à température ambiante sans agitation. Enfin la décoloration a été réalisée en plusieurs bains (de 30 min au début à 2h à la fin) de solution d'acide acétique à 10 % (v/v) jusqu'à obtenir un fond clair et des bandes nettes.

2.7.4 Analyse Dot-Blot

2.7.4.1 Principe

L'analyse dot-blot permet de détecter des protéines spécifiques dans des échantillons déposés sur une membrane. Contrairement à la méthode de western-blot, les protéines n'ont pas subi d'étape de migration précédemment. Les dépôts sont réalisés sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (« PolyVinylidene Fluoride », PVDF) ou de nitrocellulose qui lient les protéines de l'échantillon de manière non-spécifique, c'est-à-dire qu'elles lient toutes les protéines présentes dans l'échantillon de la même façon. Ces liaisons se font par des interactions hydrophobes et ioniques. Au cours de la détection, la membrane est sondée pour la protéine d'intérêt avec des anticorps, liés ensuite à une enzyme émettant généralement un signal colorimétrique. Classiquement cette méthode se réalise en deux étapes (**Figure 2.11**). La membrane est incubée dans une solution d'anticorps primaire spécifique de la protéine recherchée. Après rinçage de la membrane afin d'enlever les anticorps primaires non liés, celle-ci est exposée à un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Cet anticorps secondaire est généralement lié à une enzyme, qui, utilisée en conjonction avec un agent colorant, permet l'identification visuelle de la protéine recherchée sur la membrane.

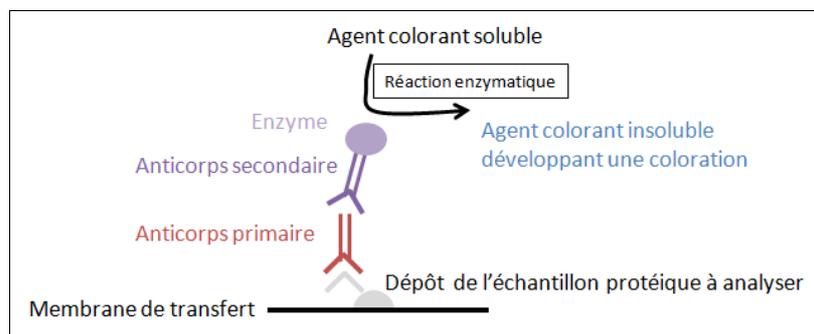


Figure 2.11 Principe de la méthode dot-blot d'immunodétection.

2.7.4.2 Protocole

Une membrane PVDF pour western-blot (GE healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Royaume-Uni) a été préalablement activée dans un bain de méthanol pendant 10 s puis rincée à l'eau à trois reprises et équilibrée dans du tampon phosphate salin (« Phosphate Buffer Saline », PBS) à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,2$ ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KCl, 7 g.L^{-1} NaCl) pendant 30 min. Par la suite, des dépôts ont été réalisés à compter de $10 \mu\text{L}$ par échantillons (solution de Nisine, surnageants de culture de LAB concentrés, échantillons intermédiaires récupérés lors de la purification d'actifs antimicrobiens à partir de surnageant de culture). Ces dépôts seront précisés lors de la présentation des résultats. Après les dépôts, la membrane a été saturée dans du lait écrémé à 5 % (m/v) (lait en poudre préparé dans du PBS) pendant 1h30 sous une agitation à 30 rpm sur une table d'agitation à température ambiante. Cette étape permet le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. Les protéines dans la solution diluée de lait se lient à la membrane dans tous les sites non occupés par la protéine cible. De ce fait, lorsque les anticorps primaires sont appliqués lors de l'étape suivante, ils ne peuvent s'attacher à la membrane que sur les sites de liaison de la protéine cible, ce qui réduit le bruit de fond, donne des résultats plus clairs et élimine les faux-positifs.

A la suite de l'étape de saturation, la membrane a été rincée 5 fois pendant 5 min dans du PBS, puis elle a été incubée dans une solution d'anticorps primaires (anticorps anti-nisine polyclonaux purifiés à partir de sérum de lapin) diluée au $1/3000^{\text{ième}}$ dans du PBS. L'incubation a été réalisée sous agitation à 30 rpm sur table d'agitation à température ambiante pendant 2h. Pour éliminer l'excès d'anticorps primaires, la membrane a été rincée dans du PBS 5 fois pendant 5 min. L'incubation dans la solution d'anticorps secondaires (anticorps anti-lapin, réf A1949, Sigma-Aldrich, Allemagne) diluée au $1/30000^{\text{ième}}$ dans du PBS a été réalisée sous agitation à 30 rpm sur table d'agitation à température ambiante pendant 1h30. Pour éliminer l'excès d'anticorps secondaires, la membrane a été rincée dans du PBS 5 fois pendant 5 min. Enfin, pour permettre la révélation, la membrane a été incubée dans une solution de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Réf T0565, Sigma-Aldrich) sous agitation à 30 rpm sur table d'agitation à température ambiante pendant 15 à 30 min à l'obscurité.

2.7.5 Identification de peptides antimicrobiens par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (SM)

L'analyse chromatographique du pool actif récupéré après séparation du surnageant de culture de LAB par chromatographie d'exclusion stérique (voir 5.3.1) a été réalisée en utilisant une colonne C4 Grade Vydac 214TP53 (reversed-phase column) (250 mm * 3,2 mm). L'échantillon à une concentration 10 mg.mL⁻¹ a été injecté à un volume de 100 µL. L'élution a été réalisée par la phase mobile composée de 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dans un mélange d'eau et d'acétonitrile. Le gradient a été programmé comme présenté dans le **Tableau 2.6**.

Tableau 2.6 Gradient utilisé pour la séparation du pool 3 par HPLC.

Temps (min)	Acétonitrile	H ₂ O
-	0	100
40	40	60
45	0	100
50	0	100

Le débit a été maintenu à 0,60 mL.min⁻¹. La détection a été réalisée en UV à 215 nm. Les données ont été acquises avec le logiciel Empower Chromatography Data Software (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, États-Unis). Chaque pic a été récupéré puis l'acétonitrile a été éliminé par centrifugation/évaporation sous vide (chauffage medium) (Speed Vaccum concentration-Rotor evaporation, Savant, Thermoscientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées par le laboratoire Probiogem selon une méthode similaire à celle présentée dans l'article Hamley *et al.* (2013).

2.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques de données ont été réalisées au travers d'une analyse de la variance (Anova) avec XLSTAT (Version XLSTAT 2010). Les différences statistiques ont été évaluées par une analyse Anova à un facteur et un test de Tukey de comparaison multiple. Dans tous les cas, $p < 0,05$ a été considéré comme indiquant une différence significative. Sur chaque figure et chaque tableau, chaque lettre indique un groupe statistiquement homogène.

CHAPITRE 3 : Sélection des souches de LAB d'intérêt et caractérisation des métabolites antimicrobiens produits par les principales souches sélectionnées

Ce chapitre présente les travaux menés pour sélectionner les souches de bactéries lactiques bioprotectrices, pour optimiser les conditions environnementales dans le but de maximiser leur activité, et pour caractériser les métabolites actifs produits par les souches sélectionnées.

*La première partie de ce chapitre sera consacrée à la sélection des souches de LAB bioprotectrices parmi la collection disponible au laboratoire BioDyMIA et les souches fournies par le partenaire du projet Actalia. Cette sélection a été réalisée d'après l'activité des surnageants de culture et des cultures entières sur trois souches de *Listeria* en milieu gélosé. Pour certaines des souches sélectionnées, des essais d'optimisation de la production des agents antimicrobiens ont été menés en supplémentant le milieu de culture en lactose ou par auto-induction en utilisant des quantités de nisine non létales.*

*Dans une seconde partie, la caractérisation des métabolites antimicrobiens des souches de LAB bioprotectrices sélectionnées sera présentée. Une pré-caractérisation a été réalisée afin de déterminer la nature des agents actifs pour deux souches de *Lactobacillus paracasei*. Pour une souche de *Lactococcus lactis*, l'identification a été conduite jusqu'à la détermination des masses molaires des peptides antimicrobiens.*

3.1 Activité antimicrobienne des LAB vis-à-vis des souches cibles de *Listeria*

3.1.1 Recherche des conditions optimales pour l'activité antimicrobienne

Ces travaux préliminaires ont consisté à observer les paramètres « simples » pouvant influencer la réponse antimicrobienne : température de croissance de la souche de LAB bioprotectrice et temps de prélèvement du surnageant au cours de la culture. Les investigations ont été menées en condition d'anaérobiose pour deux raisons. La première s'appuie sur les travaux de Moares *et al.*, en 2010, qui ont montré que les LAB produisaient plus de bactériocines ou de substances s'apparentant à des bactériocines en condition d'anaérobiose. La seconde se fonde sur le fait que les cellules vont être par la suite confinées dans des matrices polymériques avec des conditions plus proches de l'anaérobiose.

3.1.1.1 Influence de la température d'incubation sur l'activité antimicrobienne

Cette étude a été menée sur deux souches de *Lactococcus lactis* : ATCC 11454 et LAB3. *Lactococcus lactis* ATCC 11454 (Lact ATCC) a été choisie comme référence. En effet, elle est homofermentaire et reconnue comme souche productrice de nisine A (Papagianni *et al.*, 2007). Elle a été utilisée dans de nombreux travaux en biotechnologie pour optimiser la production de nisine (Meghroun *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 2002 ; Jozala *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2005 ; Papagianni *et al.*, 2007, De Arauz *et al.*, 2009). Très bien caractérisée également au niveau génétique (Steen *et al.*, 1991), certains l'ont aussi utilisée en tant que culture protectrice (Wessels et Huss, 1996) et en tant que microorganisme immobilisé dans des billes d'alginate/lactosérum pour combattre une sélection de souches (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria varians*, ...) (Millette *et al.*, 2004).

Pour déterminer la meilleure condition de température pour la production d'actifs antimicrobiens par ces deux souches de *Lactococcus lactis*, leurs surnageants récoltés lors de cultures à différentes températures ont été testés sur trois souches de *Listeria* et une souche sensible à la nisine A, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (Mota-Meira *et al.*, 2000 ; Tang et Gillevet, 2003) (**Tableau 3.1**).

Tableau 3.1 Activité antimicrobienne de surnageants de culture natifs ou neutralisés récoltés dans différentes conditions de température.

Souches de LAB	T (°C)	pH	Souches cibles								
			<i>L. monocytogenes</i> S162		<i>L. innocua</i> LRGIA01		<i>L. innocua</i> ATCC 33090		<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341		
			S	SN	S	SN	S	SN	S	SN	
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454 (Lact ATCC)	37	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	4,7	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	25	4,5	+	-	++	-	++	-	++	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> LAB3	37	3,9	+++	++	+++	+++	++	++	-	-	-
	30	4,0	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-
	20	4,4	+++	+	+++	++	++	+	-	-	-

S : Surnageant de culture ; SN : Surnageant neutralisé.

- : aucune zone ; + : zone avec un diamètre (\emptyset) ≤ 5 mm ; ++ : $5 \text{ mm} < \emptyset \leq 10$ mm ; +++ : $\emptyset \geq 10$ mm

Conditions de culture des souches de LAB pour la récupération des surnageants à 24h : milieu MRS, anaérobiose.

La gélose TSA a été inoculée avec les souches de *Listeria* ou *Kocuria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

Concernant l'activité antimicrobienne de Lact ATCC, le maximum est atteint pour un surnageant de culture à 25°C sur les 4 souches cibles utilisées. *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 est la souche la plus sensible. Sa croissance est inhibée à la fois par le surnageant de culture non neutralisé et le surnageant de culture neutralisé, alors que les souches de *Listeria* ne sont sensibles qu'au surnageant de culture non neutralisé. Cependant, pour une souche reconnue productrice de nisine, l'activité reste faible surtout sur les souches de *Listeria*. Cet effet a déjà été rapporté par Harris *et al.*, 1989, qui ont démontré un effet bactéricide de cette souche Lact ATCC sur des souches de *Listeria monocytogenes* et *innocua* (dont ATCC 33090) par un test sur milieu gélosé, mais ces activités n'ont pas été retrouvées en utilisant seulement les surnageants sans cellules, ce qui est le cas de notre étude. De plus, l'identification de l'activité antagoniste a été réalisée par la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé qui est basée sur la diffusion des substances antimicrobiennes dans la gélose. Plusieurs auteurs ont relaté les limites de cette méthode et notamment sa sensibilité : une concentration suffisante en antimicrobiens est nécessaire pour observer un halo d'inhibition sur la culture cible (Van de Guchte *et al.*, 2001 ; Millette *et al.*, 2004 ; Moraes *et al.*, 2010). Concernant spécifiquement la nisine, Chandrapati et O'Sullivan, en 1998, ont mis en avant une diffusion contrariée qui serait due notamment à la nature hydrophobe du peptide mature. Néanmoins, cette méthode a été la plus appropriée pour ce projet du fait de l'application recherchée qui est la protection de surface. La gélose a donc permis de simuler cette surface à protéger.

Les surnageants de LAB3 démontrent quant à eux une activité maximale pour une culture à

30°C. La souche de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (souche sensible à la nisine A) n'est pas sensible à ces surnageants quelle que soit la température. La nisine A ne semblerait donc pas être produite par la souche LAB3. À notre connaissance, le potentiel antimicrobien de cette souche commerciale n'a pas fait l'objet de publication. D'une part, Champagne *et al.*, en 2009, l'ont utilisée comme culture starter pour la production de saveurs dans la fabrication de fromage de type Cheddar et, d'autre part, Lamboley *et al.*, 1997, ont étudié son immobilisation dans des bioréacteurs pour produire des cultures starter mixtes. Les conditions optimales de température pour la production d'antimicrobiens sont en effet généralement différentes des conditions optimales de croissance. Les productions maximales de bactériocines de la part des LAB sont plutôt observées pour des températures comprises entre 25 et 30°C (Enan *et al.*, 1996 ; Matsusaki *et al.*, 1996 ; Todorov *et al.*, 2011) alors que les températures optimales de croissance sont plus de l'ordre de 30 à 37°C. S'appuyant à la fois sur ces premiers résultats et la littérature, la température choisie de 30°C a été choisie pour la suite.

3.1.1.2 Activité antimicrobienne des surnageants de culture en fonction du temps de prélèvements au cours de la culture

Les surnageants de LAB3 (natifs et neutralisés) ont été testés vis-à-vis de deux souches de *Listeria* en fonction du temps de culture de LAB3 auquel ils ont été récupérés : P1-7h, milieu de phase exponentielle ; P2-9h, fin de phase exponentielle ; P3-24h, phase stationnaire. Les zones d'inhibition (Z_i exprimées en mm) augmentent avec le temps de culture auquel les surnageants de culture ont été prélevés. Le maximum d'activité anti-*Listeria* pour le taux de *Listeria* testé est obtenu en phase stationnaire (**Figure 3.1**).

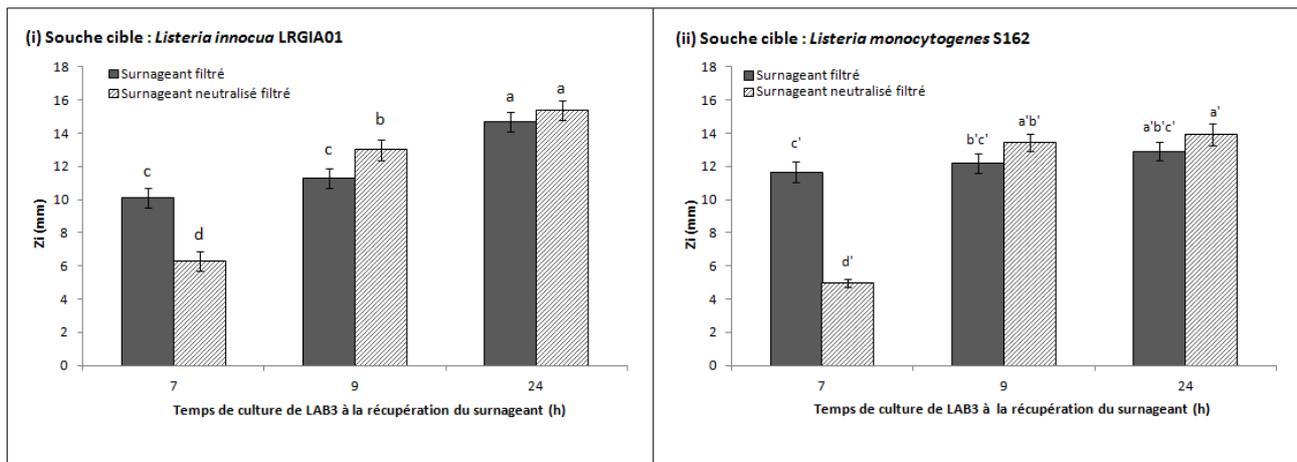


Figure 3.1 Activité antimicrobienne (diamètres des zones d'inhibition) des surnageants de culture de *Lactococcus lactis* LAB3 à 30°C en anaérobiose dans MRS_b contre deux souches de *Listeria* (*L. innocua* LRGA01 et *L. monocytogenes* S162) en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits (n=3).

Ces surnageants ont été récoltés à 3 temps différents : P1-7h, pH = 4,9 ; P2-9h, pH = 4,4 ; P3-24h, pH 4,0.

La gélose TSA a été inoculée avec les souches de *Listeria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

Sur chaque graphique, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

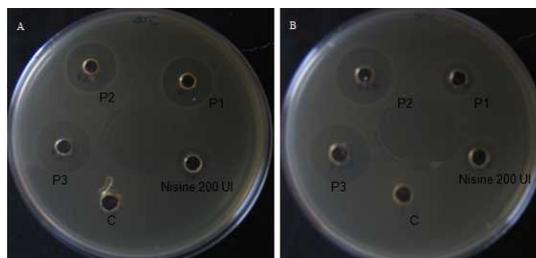


Figure 3.2 Illustration du graphique (ii) de la figure 3.1. : Activité antimicrobienne des surnageants de culture de *Lactococcus lactis* LAB3 à 30°C en anaérobiose dans MRS_b contre *L. monocytogenes* S162 en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits.

Ces surnageants ont été récoltés à 3 temps différents : P1-7h, pH = 4,9 ; P2-9h, pH = 4,4 ; P3-24h, pH 4,0.

La gélose TSA a été inoculée avec les *Listeria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

C, contrôle MRS_b seul.

La solution de nisine a été préparée à partir de Nisaplin (Danisco, Danemark) (40 µL d'une solution à 5000 UI.mL⁻¹ ont été déposés par puits).

La meilleure activité est détectée à la fin de la culture (24h). D'autres auteurs ont observé le même phénomène et cela pourrait s'expliquer par une accumulation dans le surnageant des composés antimicrobiens au cours de la croissance jusqu'à atteindre le maximum (Van de Guchte *et al.*, 2001; Trias *et al.*, 2008). Bendali *et al.*, en 2008, ont précisé qu'une souche de *Lactobacillus*

paracasei subsp. *paracasei* produit en début de phase exponentielle environ 20 UI.mL⁻¹ de bactériocine et cette concentration atteint un maximum de 320 UI.mL⁻¹ en début de phase stationnaire.

Après neutralisation des surnageants de culture (pH normalisé à 7), l'effet des surnageants sur les souches de *Listeria* est modifié. En milieu de phase exponentielle (P1 : 7h), l'activité antimicrobienne après neutralisation est réduite d'environ 50 %. Pour la suite de la croissance, il semblerait que d'autres molécules antimicrobiennes soient produites masquant l'effet du pH.

L. innocua et *L. monocytogenes* ont des propriétés physiologiques identiques à la différence que la première espèce n'est pas pathogène (Ammor *et al.*, 2006). Dans notre cas, les deux souches de *Listeria* ont montré des sensibilités et une réponse aux agents antimicrobiens de LAB3 quelque peu différentes (**Figure 3.1**) :

- pour *L. innocua* LRGIA01, les résultats à 7, 9, 24h (temps de culture de LAB3 lors du prélèvement des surnageants) forment trois groupes de données statistiquement différents ($p < 0,05$) ;
- pour *L. monocytogenes* S162, les activités antimicrobiennes des échantillons récupérés à 9h et à 24h sont semblables ($p = 0,887$).

L. monocytogenes S162 est plus sensible que *L. innocua* LRGIA01 aux composés actifs collectés (surnageant de culture filtré) à 7h et 9h, alors que *L. innocua* LRGIA01 est plus sensible que *L. monocytogenes* S162 aux agents antimicrobiens présents dans les surnageants (non neutralisé et neutralisés) récupérés à 24h. Certains travaux rapportent une sensibilité plus importante pour *L. monocytogenes* à certains composés antimicrobiens par rapport à *L. innocua*. Il y a aussi des différences de sensibilité d'une souche de *L. innocua* à une autre et d'une souche de *L. monocytogenes* à une autre (Çon *et al.*, 2001; Mataragas *et al.*, 2003). En 2001, Çon *et al.*, ont comparé la sensibilité de 9 souches de *L. monocytogenes* et de 7 souches de *L. innocua* vis-à-vis de surnageants de culture de 6 souches de LAB productrices de bactériocines. Même si les souches de *L. monocytogenes* sembleraient être plus sensibles, il est difficile d'avoir des tendances nettes même sur une étude avec un grand nombre de souches. Mataragas *et al.*, en 2003, ont testé l'effet des extraits de culture de deux souches de LAB sur 15 souches de *Listeria* (6 *L. innocua* et 9 *L. monocytogenes*). Pour la souche *Lactobacillus curvatus* L442, les souches *L. monocytogenes* sembleraient plus sensibles par rapport aux souches de *L. innocua* alors que pour la souche de

Leuconostoc mesenteroides L124, il est difficile de conclure. Par ailleurs, pour chaque composé antimicrobien, l'inhibition dépend du microorganisme cible (Richard, 1996 ; Ramos *et al.*, 2012) et il est difficile de comparer une étude à une autre du fait de la différence des méthodes et des conditions expérimentales (gamme de concentration, température, pH, milieu de culture, concentration de la population de la souche cible, état physiologique) (Ramos *et al.*, 2012).

Dans la présente étude, après neutralisation, l'activité antimicrobienne des surnageants collectés à 9h et 24h est préservée ou même augmentée (**Figure 3.1**). Par exemple, le surnageant prélevé à 9h de croissance et neutralisé a donné une zone d'inhibition vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA01 de $13,00 \pm 0,60$ mm alors que la zone avec le surnageant natif est de $11,30 \pm 0,60$ mm. Cela indiquerait que d'autres métabolites que les acides organiques sont responsables de cette activité. En effet, les acides organiques peuvent traverser la membrane de la cellule cible uniquement sous leur forme non dissociée (à un pH inférieur à leur pKa). Les valeurs de pKa des acides communément produits par les LAB sont inférieures à 5,0 (De Muyck *et al.*, 2004). Les souches de *Lactococcus lactis* produisent principalement de l'acide lactique qui a un pKa de 3,8. Donc en ajustant les valeurs de pH des surnageants à 7,0, cela devrait exclure l'activité antimicrobienne due aux acides organiques.

De plus, dans notre cas, les agents antimicrobiens autres que les acides organiques ne sont pas inactivés avec le changement de pH (**Figure 3.3**).

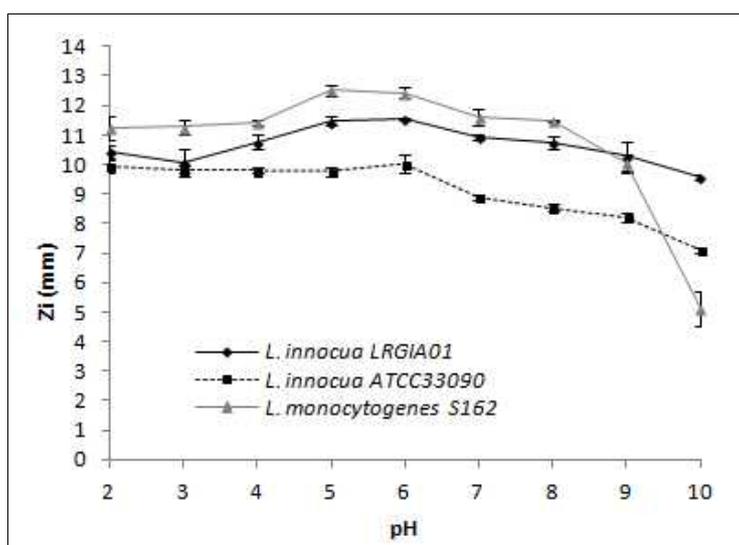


Figure 3.3 Activité anti-*Listeria* (diamètres des zones d'inhibition) du surnageant de LAB3 récolté après 24h de culture dans MRS en anaérobiose en fonction du pH par la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé (n=3).

Le surnageant de culture de LAB3 à 24h a été ajusté à différents pH et testé sur les trois souches de *Listeria*. Le surnageant est actif quel que soit le pH sur les trois souches mais les diamètres des zones subissent quand même des variations de 5 mm à presque 13 mm. Les deux souches *L. innocua* LRGIA01 et *L. monocytogenes* S162 restent les plus sensibles par rapport à *L. innocua* ATCC 33090. à pH = 5 et pH = 6, l'activité est maximale contre les souches *L. innocua* LRGIA01 et *L. monocytogenes* S162. Celle-ci chute ensuite jusqu'à pH = 10. *Listeria monocytogenes* S162 est la souche la moins sensible à pH = 10. Pour la souche *L. innocua* ATCC 33090, les diamètres des zones sont stables entre pH = 2 et pH = 6 puis comme pour les autres souches, l'activité antimicrobienne du surnageant diminue jusqu'à atteindre une activité minimale à pH = 10. Aux pH où l'activité est maximale, une action synergique de l'acide lactique et des autres molécules antimicrobiennes peut être envisagée. L'acide lactique agit comme perméabilisant de la membrane des souches cibles permettant la pénétration des autres molécules antimicrobiennes (Zhang *et al.*, 2010).

De plus, chaque molécule antimicrobienne, et notamment les bactériocines, a également une gamme de pH dans laquelle son activité est maximale. Dans la littérature, trois cas différents ont été exposés :

- l'activité de la bactériocine UO004 produite par *Lactobacillus paracasei* subsp. *lactis* UO004 est stable entre pH = 3 et pH = 10 (Boris *et al.*, 2001) ;
- l'activité de la lacticine Z produite par *Lactococcus lactis* QU14 est sensible aux pH acides compris entre 2,0 et 6,0 (Iwatani *et al.*, 2007) ;
- l'activité de la bactériocine WNC 20 produite par la souche *Lactococcus lactis* WNC 20 perd la moitié de son activité à pH = 8,0 et les trois-quarts de son activité à pH = 9,0 et 10,0 (Noonpakdee *et al.*, 2003).

Dans notre cas, l'activité du surnageant de culture de *Lactococcus lactis* LAB3 est globalement stable entre pH = 2 et pH = 8 dépendant à la fois des acides organiques et sans doute, d'autres molécules antimicrobiennes (bactériocines, peroxydes).

En plus de l'activité inhibitrice des métabolites antimicrobiens présents dans le surnageants de culture et actifs aux différents pH, un second phénomène est à prendre en compte : la sensibilité des souches de *Listeria* au pH. *Listeria monocytogenes* et *innocua* se développent dans une large gamme de pH : de 4,5 à 9,2 (Miller *et al.*, 2009). La stabilité du diamètre des zones d'inhibition notées entre pH = 4 et pH = 2 peut donc également être dû à un effet pH indépendamment de l'activité des actifs contenus dans le surnageant.

Après ces premières considérations sur un nombre de souches de LAB limité qui ont permis de fixer la température d'incubation et d'observer la sensibilité des différentes souches cibles utilisées, l'ensemble de la collection de souches de LAB a été testé pour son activité anti-*Listeria*.

3.1.2 Activité des cultures et des surnageants de culture de 19 souches de LAB en milieu gélosé contre trois souches de *Listeria*

L'objectif de ces tests préliminaires a été d'évaluer le potentiel bioprotecteur des 19 souches de LAB disponibles vis-à-vis de trois souches de *Listeria* : *Listeria innocua* LRGIA01, *L. innocua* ATCC 33090 et *L. monocytogenes* S162. Cette évaluation préliminaire a permis de mener à une première sélection des souches de LAB bioprotectrices d'intérêt pour l'application en milieu confiné dans les matrices.

Tableau 3.2 Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01, ATCC 33090 et *monocytogenes* S162 (diamètres des zones d'inhibition) des surnageants de culture (neutralisés (SN) ou non (S)) et des cultures entières (C) de 19 LAB par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé.

Souches de LAB	pH	Contre <i>L. innocua</i> ATCC 33090			Contre <i>L. innocua</i> LRGIA01			Contre <i>L. monocytogenes</i> S162		
		S	SN	C	S	SN	C	S	SN	C
<i>Lactobacillus fermentum</i> S1	4,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> S6	4,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S2	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S4	4,0	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S7	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S8	4,0	-	-	+	-	-	+	-	-	++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S9	4,1	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S11	4,0	-	-	+	+	-	++	-	-	++
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S12	4,2	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> S3	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> S5	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Lactobacillus crispatus</i> S10	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> S13	4,2	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S14 (TSB)	5,6	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> S14 (MRS)	4,6	-	-	-	++	++	++	++	++	++
<i>Lactobacillus paracasei</i> LAB1	4,2	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lactobacillus paracasei</i> LAB2	4,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lactococcus lactis</i> LAB3	4,0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Lactococcus lactis</i> LAB4	4,6	-	+	-	-	+	-	-	++	-
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	4,5	+	-	ND	++	-	ND	+	-	ND

- : aucune zone ; + : zone avec un diamètre (\emptyset) ≤ 5 mm ; ++ : $5 \text{ mm} < \emptyset \leq 10$ mm ; +++ : $\emptyset \geq 10$ mm.

ND : Non déterminé

Conditions de culture des souches de LAB pour la récupération des surnageants à 24h : milieu MRS (ou TSB pour la souche S14), anaérobiose, 30°C (25°C pour *Lactococcus lactis* ATCC 11454).

La gélose TSA a été inoculée avec les souches de *Listeria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

Le temps de prélèvements des surnageants qui a été retenu correspond à la fin de la phase exponentielle voire le début de la phase stationnaire (24h). Ce choix a été justifié par la littérature et vérifié dans des travaux préliminaires (voir 3.1.1.2) de tests d'activité de surnageants prélevés tout au long de la culture.

L'effet inhibiteur des surnageants d'une grande partie des souches (S1, S6, S2, S4, S7, S8, S9, S11, S12, S3, S5, S10, S13, S15, LAB4) est faible voire même totalement absent (**Tableau 3.2**).

Différentes hypothèses peuvent être proposées :

- les souches testées sembleraient ne pas être productrices d'agents anti-*Listeria* actifs contre les trois souches cibles retenues ;
- les conditions de culture des LAB ne seraient pas les conditions optimales pour maximiser la production d'agents antimicrobiens ;
- la quantité d'agent(s) anti-*Listeria* serait trop faible pour être détectée par la méthode des puits vis-à-vis de la sensibilité des trois souches cibles ;
- le ou les agent(s) anti-*Listeria* n'auraient pas d'effet sur ces trois souches ;
- le ou les agent(s) anti-*Listeria* ne diffusent pas dans le milieu gélosé ;
- si des bactériocines sont produites par les LAB, celles-ci pourraient être dégradées par les protéases produites par la bactérie productrice (Savijoki *et al.*, 2006) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mènerait à une baisse de concentration de bactériocines dans le milieu de culture.

Par contre pour ces mêmes souches, une faible inhibition (diamètre d'inhibition inférieur à 5 mm) apparaît lorsque le test est réalisé en présence des cellules. C'est le cas, par exemple, pour les souches S8 et S9 contre les trois souches cibles. Cela pourrait être expliqué par le phénomène de compétition nutritionnelle et pour l'espace entre les cellules de LAB et celles des souches cibles, ou bien par le fait que les agents antimicrobiens pourraient être adsorbés sur les membranes cellulaires des souches productrices (Yang *et al.*, 1992 ; Yildirim *et al.*, 2002). Le pH est un facteur important dans ce cas, puisque l'agrégation, l'adsorption des bactériocines sur la membrane ou encore la dégradation protéolytique sont des phénomènes qui dépendent du pH et qui affectent l'activité des bactériocines (Sharma *et al.*, 2010). En général, lorsque les cellules productrices présentent à leur surface des récepteurs de leur bactériocine, entre 93 et 100 % de molécules de bactériocines peuvent être adsorbées à des pH proches de 6,0 et le taux d'adsorption le plus bas (≤ 5 %) est obtenu pour des pH entre 1,5 et 2,0 (Yang *et al.*, 1992). Les bactériocines adhèrent le plus souvent aux cellules à Gram-positif qui peuvent être les cellules productrices mais aussi les cellules cibles (Yang *et al.*, 1992 ; Yildirim *et al.*, 2002). Néanmoins de nombreuses bactériocines n'adhèrent pas à la membrane de leurs cellules productrices ont également été décrites (Powell *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2008 ; Todorov *et al.*, 2011 ; Pringsulaka *et al.*, 2012).

En revanche, d'autres souches développent une activité anti-*Listeria* remarquable. Pour les souches LAB1, LAB2, LAB3, les diamètres d'inhibition mesurés après diffusion des surnageants ou des cultures entières sont supérieurs à 10 mm.

La neutralisation permet d'obtenir une première information sur la nature de l'activité anti-*Listeria*, à savoir si celle-ci est due en partie ou non à la production d'acides organiques engendrant une diminution du pH. En effet, le surnageant de S11 perd son activité contre *L. innocua* LRGIA01 après neutralisation. Cet effet inhibiteur serait dû en majeure partie à la production d'acides organiques et donc au pH acide (proche de 4) du surnageant en fin de culture. Outre la diminution du pH, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui inhibe certaines fonctions du métabolisme cellulaire (Klaenhammer, 1993 ; Hsiao et Siebert, 1999 ; Caplice et Fitzgerald, 1999).

Il est intéressant de remarquer que la sensibilité des trois souches de *Listeria* diffère. Par exemple, S14 inhibe la souche de *L. innocua* LRGIA01 et n'inhibe pas la souche *L. innocua* ATCC 33090 à partir des surnageants obtenus sur les deux milieux de culture. En revanche, les souches *L. innocua* LRGIA01 et *L. monocytogenes* S162 ont une sensibilité similaire si la culture est réalisée en milieu MRS. Cela permet par la suite de privilégier, lors des premières mises au point des protocoles, la souche *L. innocua* LRGIA01 du fait des conditions d'expérimentation moins contraignantes ne nécessitant pas de travail en laboratoire de niveau de sécurité microbiologique P2. Ces différences de sensibilité se retrouvent aussi vis-à-vis de la nisine (**Figure 3.4**).

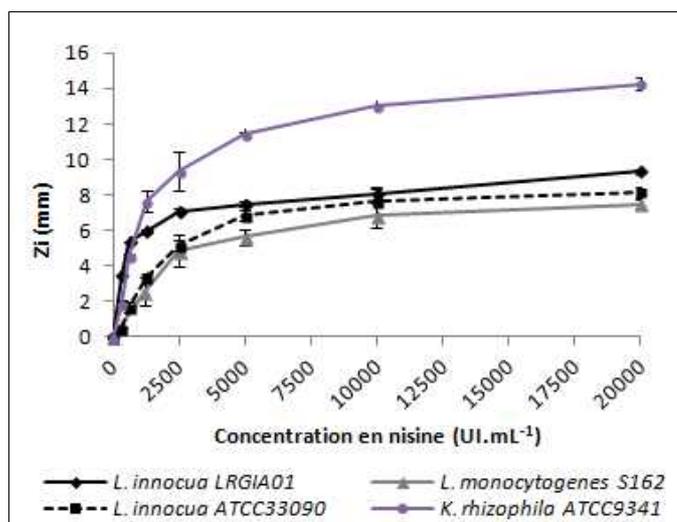


Figure 3.4 Diamètres des zones d'inhibition relevées lors de l'action de la nisine préparée à différentes concentrations sur *Listeria innocua* LRGIA01, *innocua* ATCC 33090 et *monocytogenes* S162, et *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé (n=3).

Les solutions de nisine ont été préparées à partir de Nisaplin (Danisco, Danemark). Les puits ont été remplis avec 40 μ L de ces solutions.

La gélose TSA a été inoculée avec les souches de *Listeria* ou *Kocuria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

Pour des concentrations en nisine inférieures à 5 000 UI.mL⁻¹, *L. innocua* LRGIA01 est la souche de *Listeria* la plus sensible alors qu'à des concentrations supérieures à 5 000 UI. mL⁻¹, les sensibilités des trois souches de *Listeria* sont similaires. La sensibilité des souches de *Listeria* spp. vis-à-vis de la nisine est donc souche dépendante tout comme leur sensibilité aux surnageants de culture des souches de bactéries lactiques. Razavi Rohani *et al.*, en 2011, ont déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) en nisine pour la souche de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 à 12,5 UI.mL⁻¹. Cette valeur est en accord avec d'autres travaux comme Murdock *et al.* (2007) qui ont déterminé une CMI à 25 UI.mL⁻¹ pour la souche *L. monocytogenes* Scott A. Néanmoins d'autres équipes ont reporté des valeurs beaucoup plus élevées (Thomas et Wimpenny, 1996 ; Ukuku et Shelef, 1997). Ces résultats peuvent être dus aux souches bactériennes utilisées et aux milieux. Par exemple, Benkerroum et Sandine (1988) ont déterminé la CMI en nisine pour 9 souches de *L. monocytogenes*. L'ensemble des souches testées ont été variablement sensibles et les différentes valeurs de CMI obtenues se sont réparties de 740 à 10^5 UI.mL⁻¹ sur une gélose trypticase soja et de 1,85 à 10^3 UI.mL⁻¹ sur une gélose MRS. Ces valeurs élevées obtenues dans le cas de l'utilisation de la gélose trypticase soja pourraient être dues à la forte concentration en ions bivalents dans ce milieu accentuant la résistance des souches de *Listeria* (Murdock *et al.*, 2007).

La sensibilité de la souche *K. rhizophila* ATCC 9341 est similaire à celle de *L. innocua* LRGIA01 pour une concentration en nisine inférieure à 1250 UI.mL⁻¹. Au-delà, la souche de *Kocuria* est beaucoup plus sensible à la nisine que les souches de *Listeria* spp.

Selon l'importance des zones d'inhibition obtenues pour les surnageants de culture sur les souches de *Listeria*, un choix a été effectué pour la sélection des souches de bactéries lactiques les plus performantes : *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2, *Lactococcus lactis* LAB3, *Enterococcus faecalis* S14 (cultivée dans du MRS). L'efficacité antimicrobienne de trois de ces souches (LAB1, LAB2, LAB3) a été ensuite évaluée en confinant les cellules dans des matrices d'alginate, de caséinate et d'alginate-caséinate non gélifiées puis gélifiées. Afin de disposer des premières données sur la nature des actifs antimicrobiens, une pré-caractérisation des actifs antimicrobiens des deux souches de *Lactobacillus paracasei* (LAB1 et LAB2) et de la souche de *Lactococcus lactis* LAB3 a été réalisée. De plus, une caractérisation plus large a été menée pour la souche LAB3 qui est une souche de *Lactococcus lactis*, susceptible d'être productrice de nisine. Ces données pourront être par la suite une aide à l'interprétation des phénomènes observés lors du confinement des bactéries dans les matrices polymériques.

3.2 Pré-caractérisation des métabolites antimicrobiens responsables de l'activité de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2

Les surnageants de culture des souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 ont été testés suivant la méthode de diffusion en puits afin de déterminer la part de l'activité anti-*Listeria* attribuée (i) à l'effet du pH, (ii) à des composés de nature peptidique, et/ou (iii) à des composés thermostables. Pour réaliser les différents traitements (neutralisation, traitements par des enzymes protéolytiques, traitements thermiques), le prélèvement des surnageants de culture a eu lieu en phase stationnaire après 24h de culture en anaérobiose dans du milieu MRS. Ce choix est justifié d'après la littérature et vérifié dans les travaux préliminaires similaires à ceux exposés au paragraphe 3.1.1.2 pour la souche LAB3. En effet, les surnageants les plus efficaces au niveau antimicrobien sont ceux prélevés en fin de phase exponentielle voire en phase stationnaire. Cela s'explique par une production d'agents antimicrobiens au cours de la croissance, dont la concentration dans le milieu de plus en plus importante induirait une activité antimicrobienne

croissante. Bendali *et al.* (2008) ont montré que leur souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ST242BZ produisait au maximum 12 800 AU.mL⁻¹ dans MRS à 30°C. Cette concentration était atteinte après 15h de culture et stable pendant 10h.

La **Figure 3.5** présente les tests anti-*Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 des surnageants traités de culture de LAB1 et LAB2.

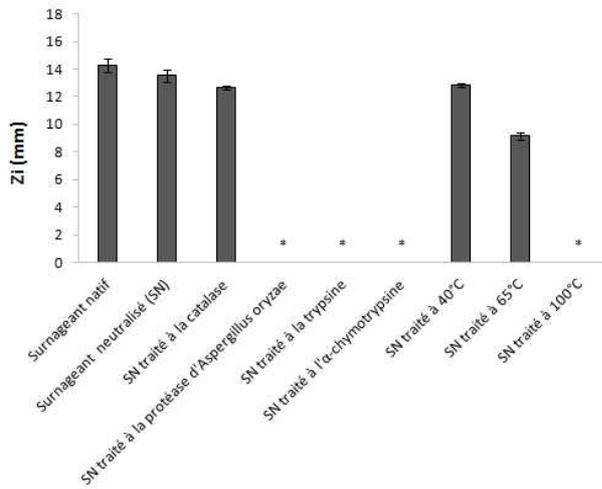
3.2.1 Activité anti-Listeria des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après neutralisation

Les valeurs initiales de pH des surnageants de culture des souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 sont proches de 4. Après neutralisation, c'est-à-dire l'élimination de l'effet pH, les activités anti-*Listeria* des surnageants des deux souches sont maintenues à plus de 90 %. L'effet pH n'est donc pas l'effet antimicrobien prédominant pour ces deux souches dans les conditions de culture utilisées (30°C, anaérobiose, milieu MRS_b). Les surnageants neutralisés ont été par la suite traités par des enzymes ou par voie thermique pour étudier le rôle des peroxydes, la nature protéique et la thermostabilité des actifs antimicrobiens.

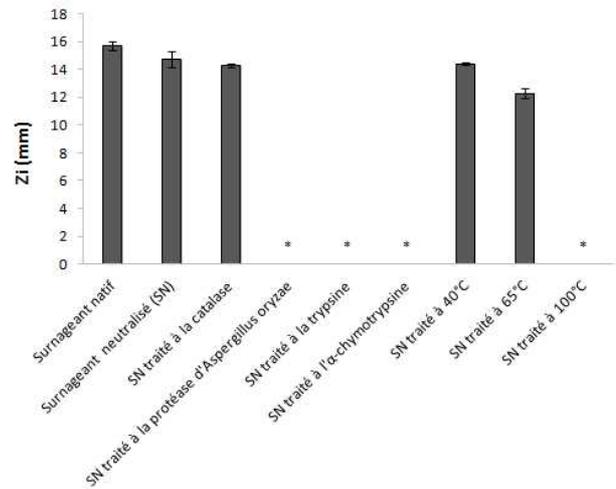
3.2.2 Activité anti-Listeria des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après traitement à la catalase

Le traitement des surnageants de culture neutralisés des souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 par la catalase n'a pas modifié l'action des deux souches sur *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC33090. Ainsi les peroxydes ne sont pas responsables de cet effet inhibiteur. Il est possible que les quantités de peroxydes mises en jeu ne soient pas suffisantes pour obtenir des différences significatives du fait de la sensibilité de la méthode utilisée. Les conditions de culture jouent aussi un rôle dans la production de peroxydes et Çon *et al.*, en 2001, ont indiqué que les conditions d'anaérobiose lors de la croissance inhibent la production de peroxydes. D'autres équipes qui ont cherché à identifier des bactériocines produites par des souches de *Lactobacillus paracasei* ont noté une activité antimicrobienne inchangée après traitement à la catalase (Todorov et Dicks, 2006 ; Pei *et al.*, 2013).

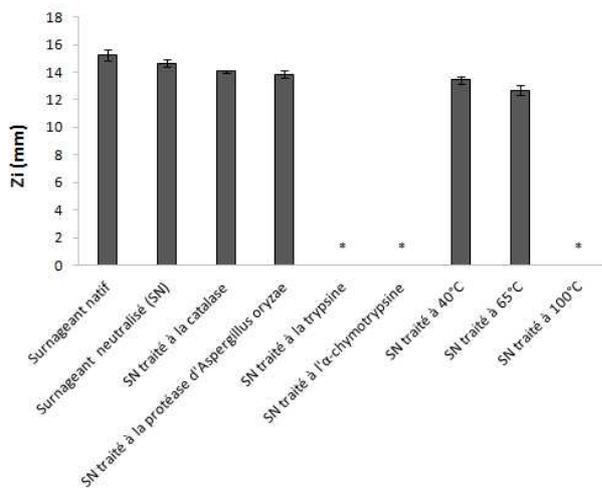
(i) Surnageant de culture de LAB1 contre *L. innocua* LRGIA01



(ii) Surnageant de culture de LAB1 contre *L. innocua* ATCC 33090



(iii) Surnageant de culture de LAB2 contre *L. innocua* LRGIA01



(iv) Surnageant de culture de LAB2 contre *L. innocua* ATCC 33090

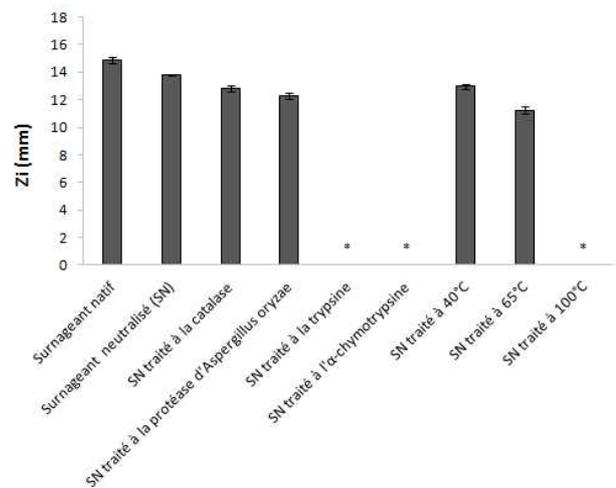


Figure 3.5 Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 (diamètres des zones d'inhibition) du surnageant de culture des souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 natif, neutralisé, traité avec des enzymes protéolytiques et traité thermiquement en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits (n=3).

*, aucune zone d'inhibition observée

La gélose TSA a été inoculée avec les souches de *Listeria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

3.2.3 Activité anti-Listeria des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après traitements avec des enzymes protéolytiques

Les surnageants neutralisés des souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 ont subi des traitements enzymatiques avec les enzymes suivantes : une protéase produite par *Aspergillus oryzae*, la trypsine et l' α -chymotrypsine. Si l'agent antimicrobien est une bactériocine, un traitement avec ces enzymes protéolytiques devrait dégrader la substance antimicrobienne et éliminer l'effet inhibiteur du surnageant.

L'absence d'un effet anti-LRGIA01 et anti-ATCC33090 des surnageants de culture de LAB1 ainsi traités nous permet de conclure que la nature de l'agent antimicrobien est protéique. Cet ou ces agent(s) antimicrobien(s) de nature protéique sont sensibles aux trois enzymes protéolytiques utilisées. Contrairement à LAB1, une activité inhibitrice des surnageants de LAB2 traités à la protéase produite par *Aspergillus oryzae* a été observée. Les agents antimicrobiens produits par LAB2 ne semblent donc pas être sensibles à la protéase mais ils sont sensibles à la trypsine et α -chymotrypsine. Les souches LAB1 et LAB2 produisent donc des agents antimicrobiens ayant des caractéristiques différentes. Pei *et al.*, 2013, évoquent en effet que des différences existent parmi les bactériocines identifiées produites par des souches de *Lactobacillus paracasei* : elles ne sont pas produites dans les mêmes conditions environnementales et elles ont des caractéristiques différentes. Cela montre que la production de bactériocines similaires n'est pas nécessairement limitée à un genre, une espèce spécifique ou à des microorganismes partageant un environnement spécifique.

3.2.4 Activité anti-Listeria des surnageants de culture de LAB1 et LAB2 après traitements thermiques

Les surnageants neutralisés ont subi des traitements thermiques à différentes températures (40°C, 65°C, 100°C) pendant une heure afin de déterminer si les substances antimicrobiennes présentes sont thermorésistantes ou non. Les traitements thermiques à 100°C ont totalement détruit le pouvoir inhibiteur des surnageants neutralisés chez LAB1 et LAB2. En revanche, après un traitement des surnageants à 40°C et 65°C pendant 1h, l'activité antimicrobienne est semblable à celle des surnageants neutralisés. La stabilité thermique est une particularité des bactériocines de faibles poids moléculaires qui serait due à la structure complexe formée par des ponts disulfures intramoléculaires stabilisant la structure secondaire et réduisant le nombre de structures dépliées possibles (effet entropique) (Oscariz et Pisabarro, 2001). Atanassova *et al.*, en 2003, ont identifié

une bactériocine produite par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3. Son activité était totalement perdue après des traitements thermiques de 5, 10 ou 15 min à 100°C. De poids moléculaire de 43 kDa, les auteurs l'ont comparée à des bactériocines de classe III ou IV du fait de sa thermolabilité. Les actifs antimicrobiens de nature protéique produits par LAB1 et LAB2, totalement dégradés à 100°C, pourraient être dans ce cas.

D'après les tests sur les deux souches de *Listeria innocua*, certains agents antimicrobiens présents dans les surnageants de LAB1 et de LAB2 peuvent donc être considérés comme étant des bactériocines ou des peptides de taille plus importante. Ammor *et al.*, 2005, ont neutralisé et traité à la catalase des surnageants de LAB, puis les ont traités thermiquement et avec des enzymes protéolytiques. Suite aux tests réalisés, l'agent antimicrobien semble être de nature protéique et stable à 80°C. Les auteurs le considèrent comme une bactériocine.

Le nombre de bactériocines identifiées produites par des souches de *Lactobacillus paracasei* reste plus restreint que pour d'autres espèces de LAB. Elles sont de divers poids moléculaires et ont des caractéristiques qui peuvent différer notamment en ce qui concerne leur sensibilité aux traitements thermiques. Pei *et al.*, 2013, ont montré que la souche *Lactobacillus paracasei* CICC 20241 produit une bactériocine dans MRS à 37°C qu'ils ont nommée paracine C sensible à la protéinase K, la pepsine, l' α -chymotrypsine, la papaïne et la trypsine ; stable à la chaleur ; de faible masse moléculaire (5 kDa) appartenant à la classe II. Todorov et Dicks, en 2004 et 2006, ont identifié trois souches de *Lactobacillus paracasei* chacune productrice d'une bactériocine : ST242BZ (~10 kDa), ST284BZ (~10 kDa) et ST11BR (3,2 kDa). L'intérêt de ces bactériocines est qu'elles sont actives contre des souches pathogènes Gram négatif comme *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour affiner la caractérisation des composés peptidiques présents dans les surnageants de culture des souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2, une purification partielle des composés actifs de nature peptidique pourrait être menée d'après le protocole de Jiang *et al.*, 2012. Cette méthode a été suivie en premier lieu sur la troisième souche sélectionnée, la souche de *Lactococcus lactis* LAB3 (potentiellement productrice de nisine) et la caractérisation des peptides actifs isolés par HPLC a été menée jusqu'à obtenir un poids moléculaire par un couplage HPLC-spectrométrie de masse dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Probiogem (Université Lille 1).

3.3 Pré-Caractérisation des métabolites antimicrobiens responsables de l'activité de *Lactococcus lactis* LAB3

La souche de *Lactococcus lactis* LAB3 a donné des activités anti-*Listeria* remarquables (voir 3.1.2). De plus, étant donné que cette espèce est potentiellement productrice de nisine (bactériocine la plus connue), les expérimentations de confinement ont été principalement réalisées avec cette souche (voir Chapitre 5). Il était donc important d'essayer de comprendre les origines de cette activité antimicrobienne.

3.3.1 Production d'acide lactique

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques qui sont produits soit par voie homofermentaire, soit par voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires (tel le genre *Lactococcus*) tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique, formique, ... chez les hétérofermentaires (tel le genre *Leuconostoc*) (Liu, 2003). Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant la flore sensible aux pH acides. Outre la diminution du pH, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, elle peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Klaenhammer, 1993). Plusieurs études ont traité de l'effet de ces acides organiques sur la croissance de certains pathogènes telle que celle de Hsiao et Siebert (1999) qui ont montré qu'une concentration en acide acétique de :

- 0,105 g.L⁻¹ inhibait la croissance de *Bacillus subtilis* (pH de 5,3),
- 27,5 g.L⁻¹ inhibait *Lactobacillus plantarum*,
- 1,6 g.L⁻¹ inhibait *Escherichia coli*.

Concernant *Listeria monocytogenes*, l'Organisation Mondiale pour la Santé écrit dans un rapport en 2004 que la CMI en acide lactique est compris entre 3,8 et 4,6 mmol.L⁻¹. Najjar *et al.*, en 2009, ont testé la capacité de 4 souches de *L. monocytogenes* (Scott A, NR30 (ATCC 700302, dérivée de Scott A et résistante à la nisine à 30°C), 10403s, cld1 (dérivée de 10403s et sensible aux basses températures)) à se développer dans un bouillon cœur-cerveille acidifié de pH = 7,0 à pH = 3,5 avec de l'acide lactique. Aucune croissance pour l'ensemble des 4 souches n'a été observée à des valeurs

de pH inférieures ou égales à 5,0. Ils ont donc établi que la valeur de pH = 5,5 était la plus faible valeur de pH pour laquelle leur 4 souches de *L. monocytogenes* restaient viables en utilisant l'acide lactique comme agent acidifiant.

La production d'acide lactique a donc été étudiée pour la souche de LAB bioprotectrice d'intérêt LAB3 au cours d'une culture à 30°C en milieu MRS en anaérobiose (**Figure 3.6**).

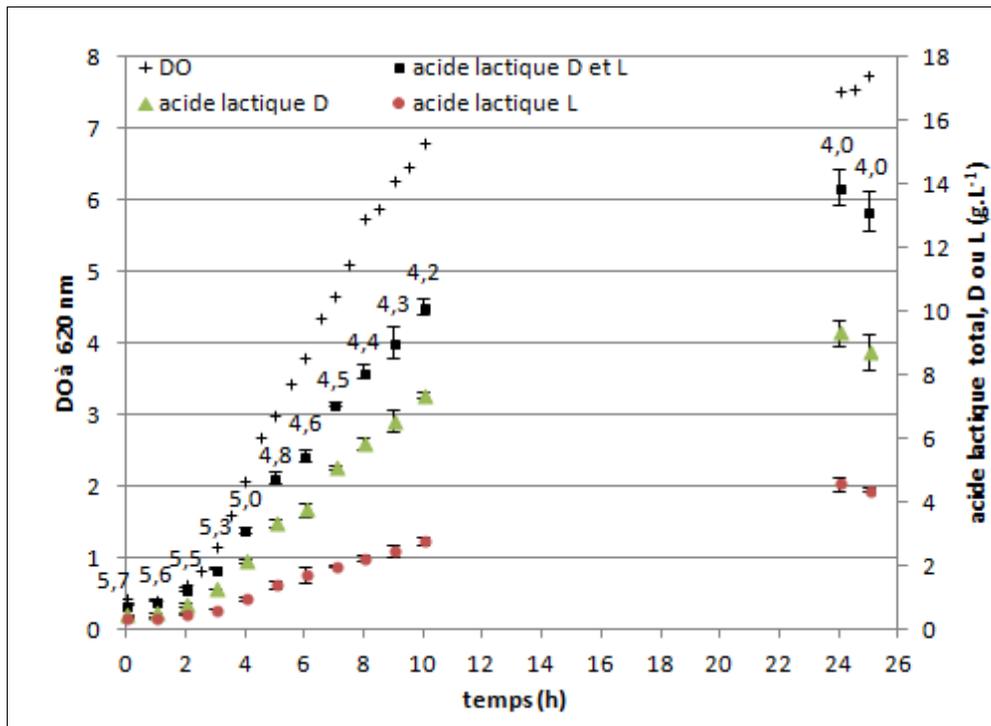


Figure 3.6 Courbe de croissance et de production d'acide lactique (formes D et L) de la souche LAB3 dans MRS à 30°C en anaérobiose (n=3).

Les valeurs inscrites au-dessus des points sont les valeurs de pH des surnageants.

La production d'acide lactique suit la croissance de LAB3. Cette souche de *Lactococcus lactis* LAB3 produit un mélange d'acide lactique de la forme L et d'acide lactique de forme D. Néanmoins, la forme D est majoritaire. En fin de culture, la concentration maximale atteinte est d'environ 13 g.L⁻¹ (total formes D et L). La forme d'acide lactique produite dépend des conditions de fermentation (température, pH, nutriments, mode de culture) de la bactérie homofermentaire. Généralement, les LAB synthétisent un mélange de la forme D et L (Shi *et al.*, 2012). Néanmoins, les souches de *Lactococcus lactis* sont connues pour produire préférentiellement la forme L (Hartmann *et al.*, 2011). Dans un milieu contenant de l'extrait de levure et du glucose, à 30°C avec 5 % de CO₂ dans l'atmosphère, la souche de *Lactococcus lactis* IDE0290 produit 66 g.L⁻¹ de forme

L et une quantité inférieure à 3 g.L⁻¹ de forme D (Hartmann *et al.*, 2011). Très peu de souches ont été identifiées comme produisant uniquement la forme D ou presque : *Lactobacillus delbrueckii* LD0025 et LD0028, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* ATCC 25600 et *Lactococcus lactis* NCIM 2368 (Tashiro *et al.*, 2011).

D'après les tests réalisés précédemment par diffusion en puits en milieu gélosé, l'activité anti-*Listeria* de LAB3, après neutralisation du surnageant, est due en grande partie à d'autres mécanismes que l'acidification par production d'acides organiques. Pour la compréhension des mécanismes de diffusion des agents antimicrobiens, il était intéressant de chercher à déterminer la nature des différents agents antimicrobiens produits (peroxydes, bactériocines, ...). Pour cela, dans un premier temps, différents traitements ont été réalisés sur le surnageant et l'activité anti-*Listeria* résiduelle a été mesurée en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits. Ces différents traitements permettent de déterminer si les agents antimicrobiens sont des peroxydes, et/ou de nature protéiques sensibles à différentes enzymes protéolytiques, et/ou thermostables.

3.3.2 Neutralisation, traitements enzymatiques et thermiques des surnageants

Les surnageants de culture de LAB3 à 30°C dans du MRS en anaérobiose ont été récupérés en fin de culture à 24h, neutralisés et ont été traités à différentes températures (40, 65 et 100°C pendant 1h) ou avec des enzymes protéolytiques. L'activité antimicrobienne a été mesurée par la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé contre la souche de *L. innocua* LRGIA01. Les mêmes protocoles ont été appliqués sur une solution de nisine pour comparer les réponses (**Figure 3.7**).

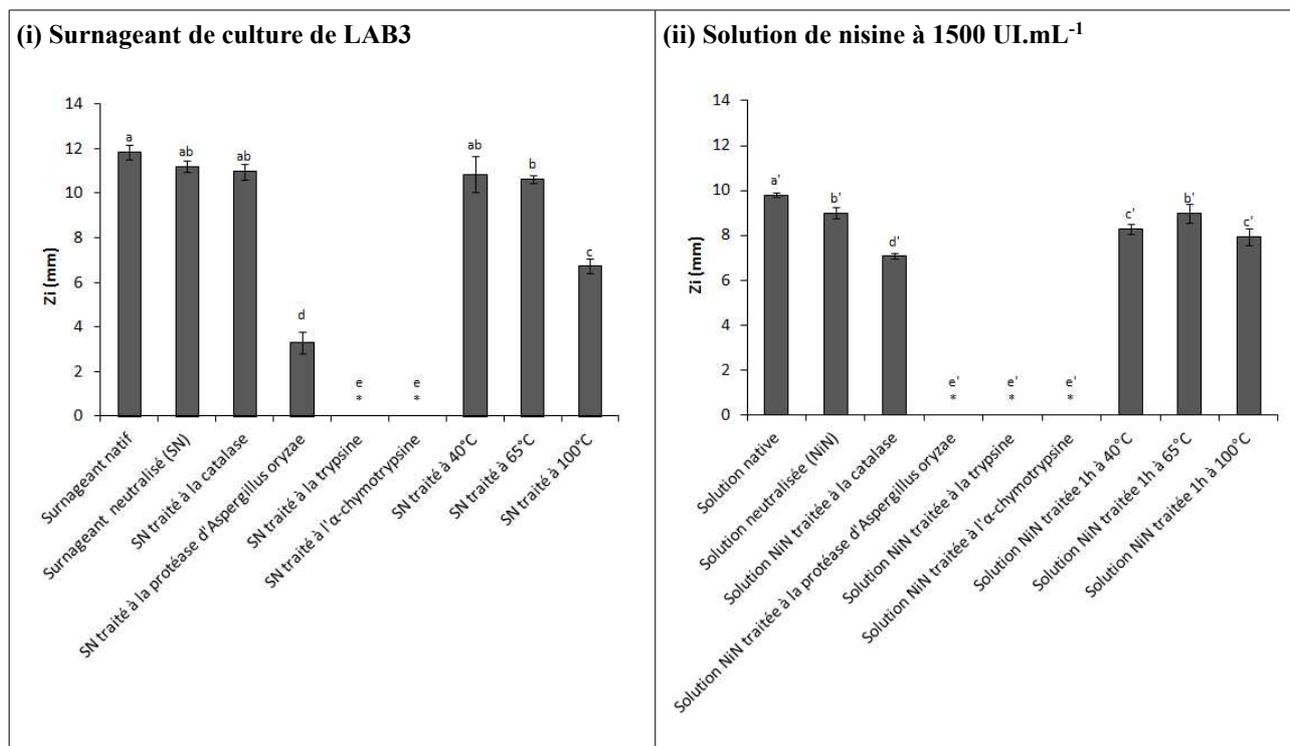


Figure 3.7 Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 (diamètres des zones d'inhibition) du surnageant de LAB3 et d'une solution de nisine neutralisés, traités avec des enzymes protéolytiques et traités thermiquement en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits (n=3).

Sur chaque graphique, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

La solution de nisine a été préparée à partir de Nisaplin (Danisco, Danemark).

La gélose TSA a été inoculée avec les *Listeria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

*, aucune zone d'inhibition observée.

En présence du surnageant de LAB3 natif (pH = 4), du surnageant neutralisé et du surnageant traité à la catalase, les zones d'inhibition vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA01 sont similaires. L'effet pH n'est donc pas le mécanisme inhibiteur majoritaire contenu dans les surnageants de culture de LAB3 dans les conditions utilisées. En effet, la concentration et le type d'acides organiques produits pendant une culture par des LAB dépendent de l'espèce, de la souche mais aussi de la composition du milieu et des conditions de croissance (pH, température, anaérobiose/aérobiose) (Ammor *et al.*, 2006).

De plus, l'activité antimicrobienne n'est pas sensible à un traitement à la catalase : les peroxydes ne sont pas non plus responsables de ce taux d'inhibition ou ne représentent qu'une très faible part que la méthode du test appliqué ne peut pas détecter. La première hypothèse serait en accord avec la littérature, puisque les conditions d'anaérobiose ne permettraient pas la production de peroxydes

(Çon *et al.*, 2001).

Les composés actifs sont également résistants aux traitements thermiques à 40 et 65°C. L'activité anti-*Listeria* est partiellement détériorée par le traitement à la protéase (origine *Aspergillus oryzae*) (perte de deux tiers du diamètre de la zone d'inhibition) et par le traitement thermique à 100°C (perte d'un tiers du diamètre de la zone d'inhibition). Elle est totalement dégradée par les traitements à la trypsine et à l' α -chymotrypsine. Le profil se rapproche de celui de la nisine (**Figure 3.7** (ii)). Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'une partie des substances antimicrobiennes produites par LAB3 sont d'origine peptidique. Les surnageants de culture de LAB3 inhibent le développement de *L. innocua* LRGIA après avoir subi un traitement thermique mais n'inhibent plus après avoir subi des traitements avec des enzymes protéolytiques. Ces résultats concordent avec les propriétés antimicrobiennes que peuvent avoir des petites molécules thermostables : les bactériocines. Les souches de *Lactococcus lactis* peuvent produire plusieurs types de bactériocines (de classe I et II) : la nisine (formes A, Z, Q, F) (~3 kDa), la Lacticine 481 (~3 kDa) (produite par *L. lactis* CNRZ481, ADRIA85LO30), la Lacticine 3147 (~3kDa) (produite par *L. lactis* DPC3147), la Lactococcine MMFII (produite par *L. lactis* MMFII), la Lactococcine G, la Lactococcine M (Parente et Ricciardi, 1999 ; McAuliffe *et al.*, 2001 ; Chen et Hoover, 2003 ; Bierbaum et Sahl, 2009 ; Alkhatib *et al.*, 2012). Il semblerait qu'à chaque souche corresponde une bactériocine précise. Les investigations ont été poursuivies pour purifier et identifier ce ou ces composés antimicrobiens peptidiques produits par LAB3.

3.3.3 Purification et caractérisation du (des) peptide(s) antimicrobien(s) produit par LAB3

3.3.3.1 Séparation des composés peptidiques du surnageant de culture de LAB3 par chromatographie d'exclusion et activité antimicrobienne résultante

Dans le but de confirmer que des agents antimicrobiens présents dans le surnageant de culture de LAB3 sont de nature peptidique, les protéines du surnageant récupéré à 24h de culture dans MRS à 30°C en anaérobiose ont été précipitées en utilisant une solution saturée de sulfate d'ammonium puis séparées par une chromatographie d'exclusion. Le profil obtenu présenté **Figure 3.8** a permis de définir 6 zones. Les fractions ont été réunies en fonction de ces zones sous forme de pools qui ont été testés natifs pour leur activité anti-*Listeria* (**Figure 3.9**). Ils ont également été

testés après avoir été traités thermiquement et par des enzymes protéolytiques (**Figure 3.13**).

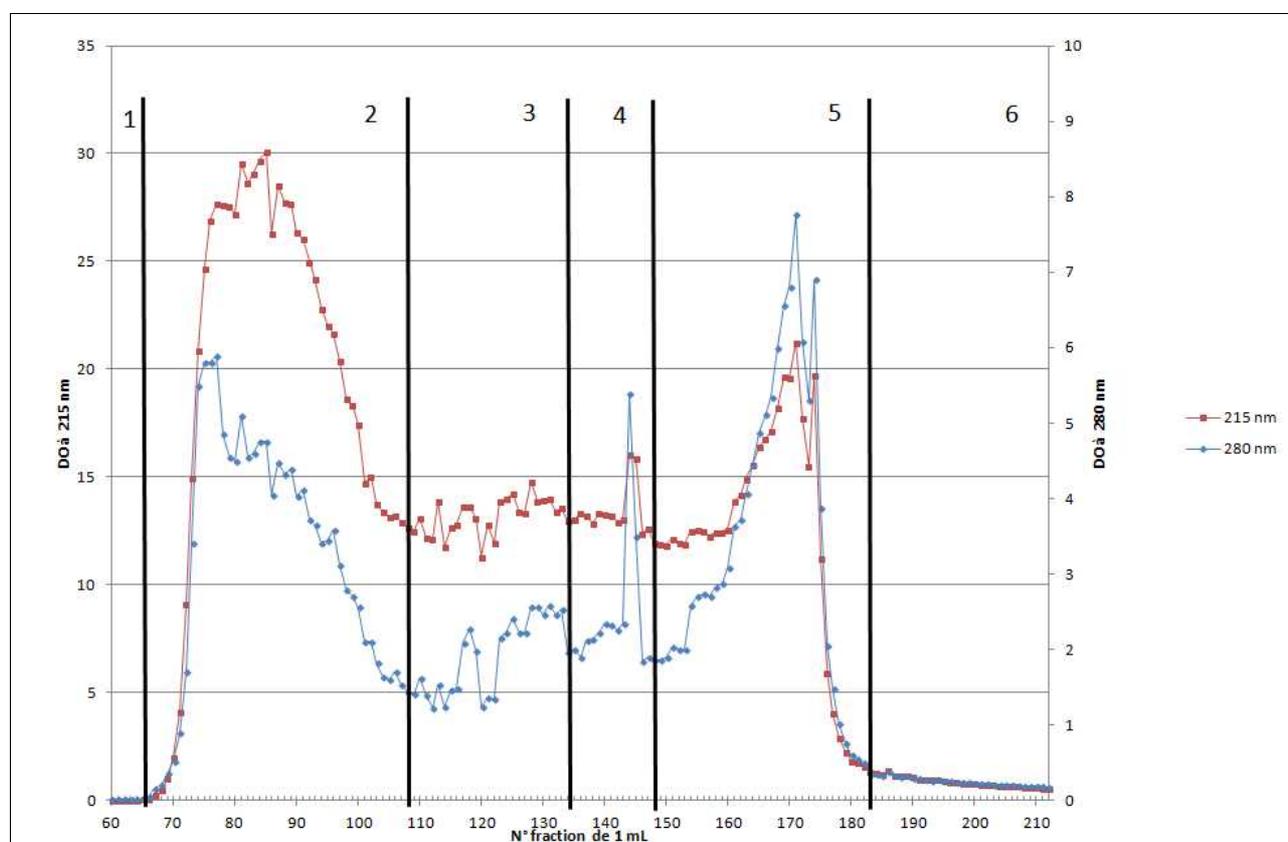


Figure 3.8 Chromatogramme obtenu par séparation à partir d'une colonne de chromatographie d'exclusion (gel Sephadex) d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 précipité au sulfate d'ammonium.

D'après les pics d'absorbance relevés aux longueurs d'onde caractéristiques des composés peptidiques, six zones ont été découpées pour tester ces différents pools pour leur activité anti-*Listeria* en milieu gélosé par la méthode de diffusion en puits (**Figure 3.9**).

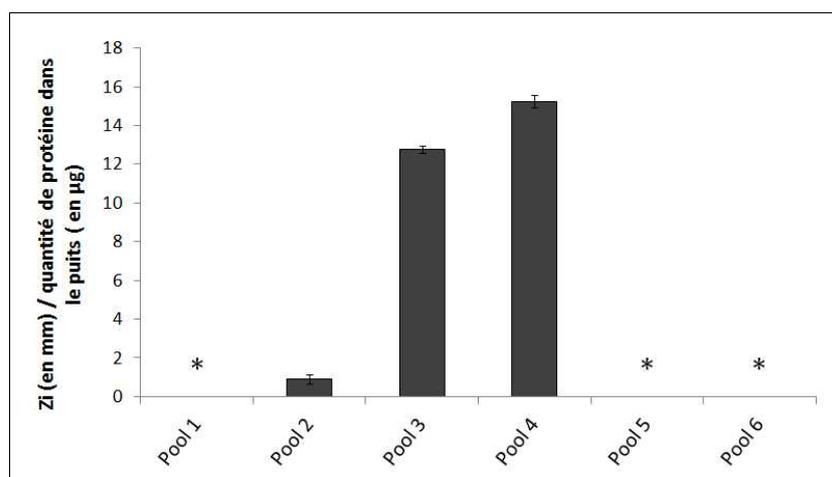


Figure 3.9 Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 (diamètres des zones d'inhibition) par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé des 6 pools de fractions recueillies après la chromatographie d'exclusion d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium (n=3).

La gélose TSA a été inoculée avec les souches de *Listeria* à 10^7 UFC.mL⁻¹.

*, aucune zone d'inhibition observée.

Les valeurs du diamètre d'inhibition ont été calculées relativement à la quantité de protéine dosée par la méthode de microbradford dans chaque pool. Le pool 2 a une concentration en protéine de $0,421 \pm 0,100$ g.L⁻¹ très élevée par rapport aux pools 3 et 4 qui ont des concentrations protéiques environ 20 fois moins importantes respectivement de $0,022 \pm 0,003$ g.L⁻¹ et de $0,016 \pm 0,005$ g.L⁻¹. Seuls les pools 2, 3 et 4 présentent des activités anti-*Listeria*. L'activité du pool 2 en fonction de la quantité de protéines est donc beaucoup plus faible par rapport à l'activité importante des autres pools qui eux ont une concentration protéique moindre. Il est alors intéressant d'étudier si ces activités étaient affectées par différents traitements pour confirmer la nature peptidique de ces activités antimicrobiennes : neutralisation, traitements enzymatiques et thermiques. Les résultats sont présentés en **Figure 3.10** pour les trois pools sélectionnés toujours en fonction de leur quantité de protéines respective. L'activité antimicrobienne des pools 2, 3, 4 est dégradée dans sa totalité après traitements des pools par les trois enzymes protéolytiques utilisées pour ce test. En revanche, elle est stable après neutralisation pour les trois pools et après application des traitements thermiques pour les pools 3 et 4. Ces résultats montrent que les agents antimicrobiens contenus dans les pools 3 et 4 sont de nature protéique et sont thermostables. Ces comportements sont comparables à ceux que l'on peut observer avec une solution de nisine (présenté sur la même **Figure 3.10**). Ces agents peuvent donc être classés comme des bactériocines semblables à la nisine (« Nisin

Like Substance ») (Cheigh *et al.*, 2002 ; Mitra *et al.*, 2005).

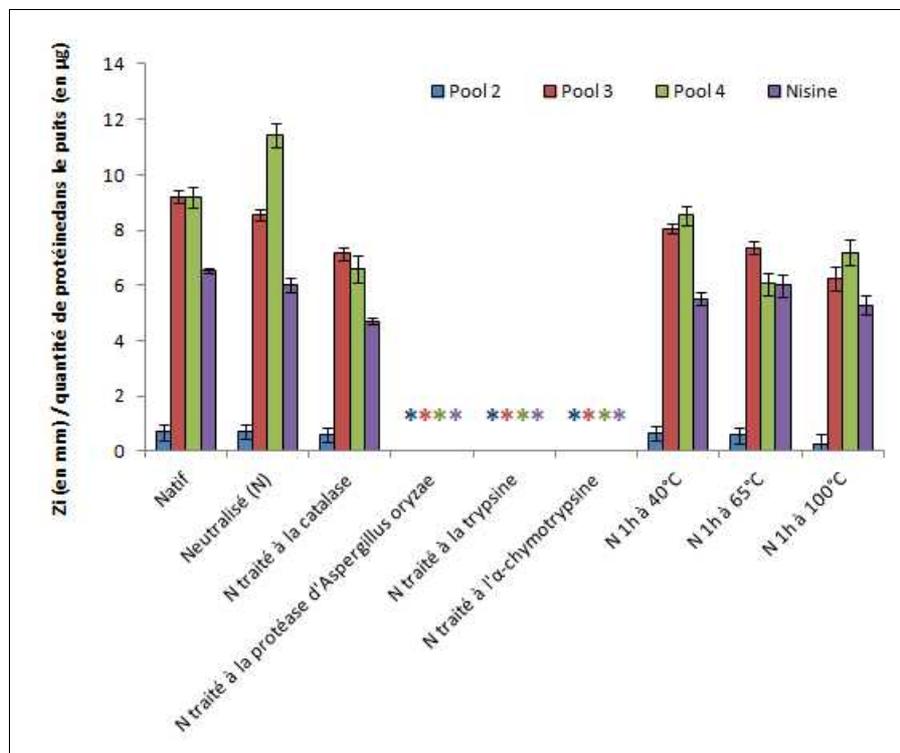


Figure 3.10 Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 (diamètres des zones d'inhibition) par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé des pools 2-3-4 (neutralisés, traités par des enzymes et thermiquement) formés à partir des fractions recueillies après la chromatographie d'exclusion d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium (n=3). Comparaison avec une solution de nisine à 1 500 UI.mL⁻¹.

La gélose TSA a été inoculée avec les souches de *Listeria* à 10⁷ UFC.mL⁻¹.

La solution de nisine a été préparée à partir de Nisaplin (Danisco, Danemark).

*, aucune zone d'inhibition observée.

pH pool natif : 1, pH = 5,8 ; 2, pH = 5,5 ; 3, pH = 4,6 ; 4, pH = 4,0 ; 5, pH = 4,1 ; 6, pH = 7,0.

De plus, ces pools, après avoir été concentrés 40 fois par lyophilisation, ont été déposés sur un gel de Tricine-SDS-Page pour visualiser les bandes de peptides et essayer de déterminer un poids moléculaire.

3.3.3.2 Analyse électrophorétique

Une bande a été détectée dans le pool 3 avec un poids moléculaire compris entre 4 et 5 kDa d'après l'échelle de poids moléculaires du marqueur (**Figure 3.11**). Aucune bande n'a été révélée pour les autres pools (4, 5, 6) malgré une activité antimicrobienne pour le pool 4 comparable à celle du pool 3. Le pool 2 n'a pas migré sur le gel. Ce pool correspond aux premières fractions éluées lors

de la chromatographie d'exclusion stérique. Ces composés peptidiques de plus haut poids moléculaires pourraient être les nutriments présents dans le milieu de culture initialement non consommés. Seules les investigations concernant le pool 3 ont été poursuivies.

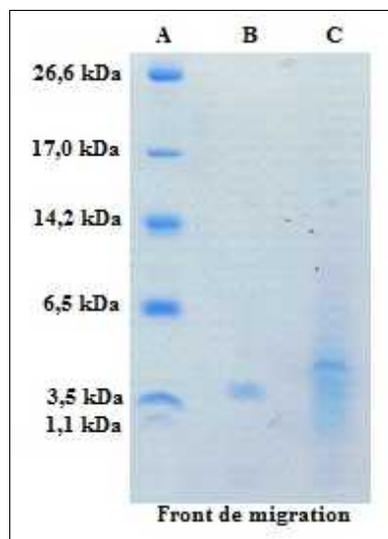


Figure 3.11 Gel d'électrophorèse Tricine-SDS-Page révélant la présence de composés peptidiques dans les pools de fractions obtenus par chromatographie d'exclusion d'un échantillon de surnageant de culture de LAB3 ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium.

A : Marqueur Ultra-low M3546 (10 μ L) ; B : nisine 10000 UI.mL⁻¹ (10 μ L) ; C : Pool 3 concentré 40 fois (10 μ L)
La solution de nisine a été préparée à partir de Nisaplin (Danisco, Danemark).

Tous ces résultats ont permis de définir les composés antimicrobiens présents dans le surnageant de culture de la souche LAB3. En plus de l'activité due aux acides organiques, des agents peptidiques sont produits dont notamment un peptide thermostable de 4 à 5 kDa sensible à la trypsine, l' α -chymotrypsine et à la protéase produit par *Aspergillus oryzae*.

3.3.3.3 Analyse HPLC-Spectrométrie de Masse

Le pool 3, ayant révélé une bande entre 4 et 5 kDa en électrophorèse, a été analysé en HPLC-MS. Le chromatogramme obtenu est présenté sur la **Figure 3.12** et révèle que l'échantillon n'est pas pur. La purification avec le protocole mis en œuvre n'est donc que partielle. Chaque pic (1 à 25) a été récolté, le solvant a été évaporé puis le test antimicrobien en milieu gélosé a été réalisé pour détecter les pics actifs (concentration à 1 mg.mL⁻¹). Les pics 22 et 23 ont montré une activité antimicrobienne à 1 mg.mL⁻¹, leur masse a alors été déterminée par analyse en spectrométrie de masse. Quatre masses ont été relevées :

- pour le pic 22 : 4,581 et 4,623 kDa ;
- pour le pic 23 : 4,608 et 4,640 kDa.

Ces masses ont confirmé les résultats obtenus par électrophorèse. La différence entre les deux masses détectées pour le pic 22 est de 42 Da, ce qui pourrait correspondre à une acétylation du résidu N-terminal du peptide (Birkemo *et al.*, 2003). En ce qui concerne le pic 23, la différence de masse de 32 Da n'a pas trouvé d'explication. L'échantillon n'étant pas pur, il se pourrait que ces différences de masses soient dues à des impuretés (sels résiduels par exemple). Les masses étant très proches, il se pourrait qu'il y ait un seul peptide actif. Avec toutes les données de caractérisation récoltées, ce peptide pourrait appartenir à la classe I (Lantibiotiques) (masse molaire inférieure à 5 kDa et thermostabilité) d'après la classification de Reis *et al.* (2012). De la même manière, Iwatani *et al.*, en 2007, ont identifié la lacticin Z produite par la souche *Lactococcus lactis* QU14 de masse molaire 5 968,9 Da thermostable.

Néanmoins, il se pourrait aussi que *Lactococcus lactis* LAB3 produise deux peptides actifs ayant une action complémentaire. Ce cas a précédemment été mis en évidence par Nissen-Meyer *et al.*, en 1992, pour la souche *Lactococcus lactis* LMG2081. Ces auteurs ont identifié deux peptides, $\alpha 1$ et β , de poids moléculaires respectifs de 4,376 et de 4,109 kDa. Ils ont englobé ces deux entités sous le nom de Lactococcine G.

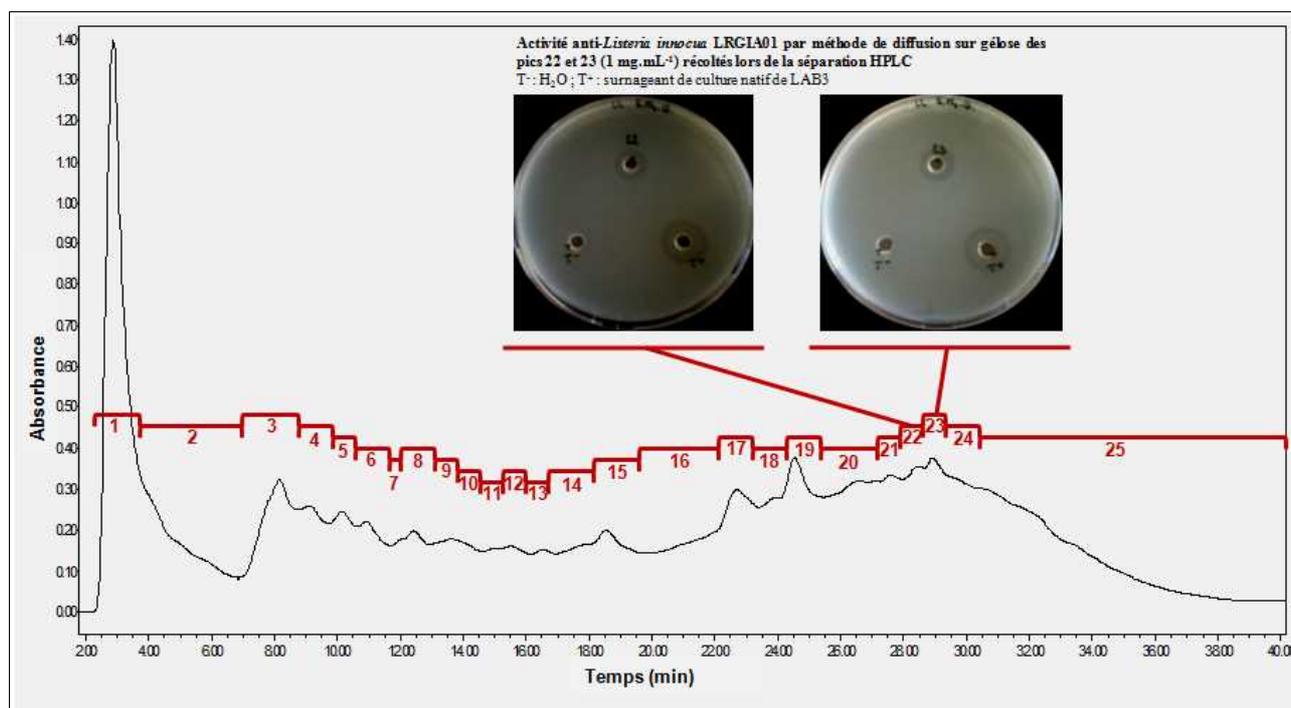


Figure 3.12 Chromatogramme d'HPLC de l'échantillon pool 3 (détection à 215 nm).

Pendant le temps dédié à ce projet de thèse, l'identification n'a pas pu aboutir à un séquençage du fait d'un manque de matériel disponible.

3.3.3.4 Essai d'immunodétection de la nisine par dot-blot

Les test dot-blot pour la détection de la nisine ont été mis au point dans les années 1990 pour détecter et quantifier la nisine dans des milieux complexes (Bouksaim *et al.*, 1998). Les limites de détection de la nisine A sont, par exemple, de $1,9 \cdot 10^{-2}$ UI.mL⁻¹ dans une solution de nisine pure et de 9,25 UI.mL⁻¹ dans du fromage (Falahee *et al.*, 1990 ; Falahee et Adams, 1992).

Les surnageants de culture des souches de *Lactococcus lactis* Lact ATCC (productrice de nisine A) et LAB3 ont été déposés sur la membrane. De plus, les six pools des différentes fractions recueillies après séparation par chromatographie d'exclusion du surnageant de culture de la souche LAB3 ont également été testés (Figure 3.13).

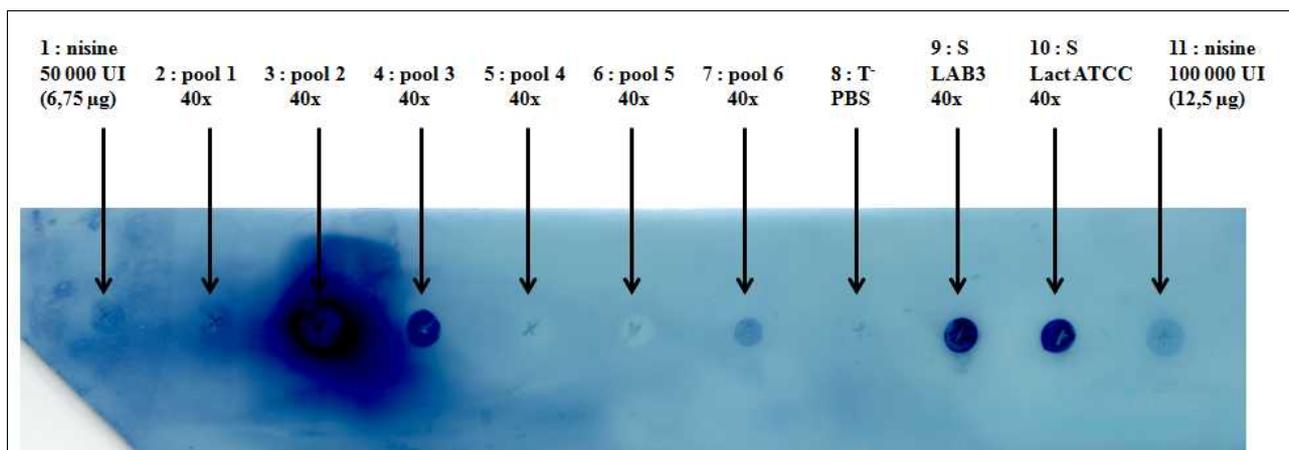


Figure 3.13 Détection de la nisine par dot blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la nisine A et détection par colorimétrie.

40x : concentré 40 fois par lyophilisation.

S : surnageant de culture récupéré à 24h d'une culture en anaérobiose à 30°C dans du MRS_b.

La solution de nisine a été préparée à partir de Nisaplin (Danisco, Danemark).

Deux dépôts d'une solution de nisine (à deux concentrations différentes : dépôts 1 et 11) permettent de quantifier qualitativement en fonction de la réaction de coloration. Les réponses pour les pools 1, 4, 5 et le témoin PBS sont négatives. Les surnageants de culture des deux souches, Lact ATCC et LAB3, sont positifs à la détection de la nisine. Pour la souche Lact ATCC, ces résultats sont en accord avec la littérature qui cite cette souche comme productrice de nisine A (Mota-Meira *et al.*, 2000 ; Tang et Gillevet, 2003). Concernant la souche LAB3, elle serait donc productrice de nisine mais ces résultats ne sont pas confirmés par les analyses HPLC-MS. En effet, un peptide antimicrobien a été détecté mais d'un poids moléculaire compris entre 4 et 5 kDa qui ne correspond pas à celui de la nisine. Cette nisine est retrouvée dans les pools 2 et 3. La détection positive pour le pool 6, qui représente la fin de l'élution, est inexplicée.

La souche LAB3 (culture « starter » commerciale identifiée comme étant *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1) (Lamboley *et al.*, 1997) pourrait donc produire plusieurs peptides antimicrobiens simultanément. O'Sullivan *et al.*, en 2006, ont précédemment rapporté la co-production de deux antibiotiques lactique 3147 et lacticine 481 pour une souche « starter » de *Lactococcus lactis* DPC5552pMRC01.

3.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, les résultats des tests antimicrobiens en milieu gélosé de 19 souches

de LAB ont été discutés. Les souches cibles choisies ont été trois souches de *Listeria* spp. Quatre souches ont été sélectionnées pour leurs propriétés de bioprotection :

- deux souches de *Lactobacillus paracasei* : LAB1 et LAB2,
- une souche de *Lactococcus lactis* : LAB3,
- une souche d'*Enterococcus faecalis* : S14.

Pour LAB1 et LAB2, les deux souches de *Lactobacillus paracasei*, la pré-caractérisation des métabolites antimicrobiens a montré que leur activité antimicrobienne est en grande partie due à des peptides thermolabiles qui pourraient être considérés comme des bactériocines de classe III ou IV.

La troisième souche principalement sélectionnée, la souche de *Lactococcus lactis* LAB3, produit de l'acide lactique dont la concentration atteint en fin de culture 13 g.L⁻¹. Mais l'effet pH n'est pas le mécanisme majoritaire de l'action antimicrobienne de cette souche. Un protocole de caractérisation, plus poussé que celui pour LAB1 et LAB2, a permis d'identifier un ou deux peptides antimicrobiens de masses moléculaires d'environ 4,5-4,6 kDa. L'identification complète (séquençage) n'a pas pu encore aboutir.

Le travail sur la souche d'*Enterococcus faecalis* S14 s'est avéré plus compliqué. En effet, le comportement de croissance est différent des trois autres souches étudiées, avec notamment une température de croissance de 42°C par rapport à une température de 30°C pour les trois autres souches. Les protocoles mis en œuvre pour les souches LAB1, LAB2, LAB3 n'ont pas pu être à ce jour mis au point pour cette souche. Seuls les souches LAB1, LAB2, LAB3 ont été testées pour leur potentiel antimicrobien lorsque les cellules sont confinées dans les matrices alginate/caséinate.

Ces travaux ont permis de mieux connaître les souches de LAB bioprotectrices sélectionnées avant leur confinement et l'étude de leur action bioprotectrice dans les matrices d'alginate de sodium/caséinate de sodium.

CHAPITRE 4 : Formulation et caractérisation des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium liquides et gélifiés

Ce chapitre est consacré à la caractérisation des systèmes polymériques alginate de sodium/caséinate de sodium qui vont servir de supports pour le confinement des bactéries lactiques bioprotectrices.

Dans un premier temps, l'alginate de sodium et les caséinates de sodium utilisés dans cette étude ont été partiellement caractérisés (analyse RMN¹H de l'alginate, mesures des potentiel Zêta).

Par la suite, le comportement du mélange alginate de sodium/caséinate de sodium a été défini par la réalisation de diagrammes de phases à trois pH différents : 7,0 ; 6,0 et 5,5. Lors du confinement de cellules de Lactococcus lactis LAB3 dans ce mélange polymérique pour étudier leur activité bioprotectrice, l'ajout d'un milieu nutritif (MRS_b) à la matrice polymérique s'est avéré essentiel. L'influence de cet ajout à 20 % (m/m) dans le mélange alginate de sodium/caséinate de sodium a alors été testée dans un premier temps au niveau macroscopique.

Ce chapitre se poursuit par une étude des microstructures des différents mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium. En utilisant la microscopie confocale en marquant la phase protéique (par la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC)), les microstructures étudiées ont été visualisées permettant de choisir une formulation de travail avec laquelle les essais de confinement des cellules de LAB ont été menées. Après ajout des cellules de bactéries lactiques, la localisation des cellules a été observée dans les systèmes liquides et gélifiés par microscopie confocale et par microscopie électronique à balayage. Ces essais ont été réalisés avec les souches de Lactobacillus paracasei LAB1 et LAB2, et la souche de Lactococcus lactis LAB3. La localisation des bactéries dans les matrices est discutée selon les propriétés de surface des cellules.

Une partie de ces résultats concernant la souche LAB3 dans le système liquide biphasique alginate de sodium/caséinate de sodium a été publiée dans le journal « Colloids and Surfaces B: Biointerfaces » (Léonard et al., 2013).

4.1 Caractérisation de l'alginate de sodium et des caséinates de sodium

4.1.1 Composition des poudres

Les matières premières brutes utilisées (caséinate de sodium (Acros Organics, Geel, Belgique) et alginate de sodium (Fischer Scientific, Hampton, Hampshire, États-Unis) ont été partiellement caractérisées.

Le taux de protéine total de la poudre de caséinate de sodium a été déterminée par la méthode du Kjeldahl (en utilisant un facteur de conversion égal à 6,38) et est de $93,4 \pm 6,4$ % (m/m). La teneur en eau (déterminée selon la norme NF B 51-004, AFNOR, 1985) et le taux de cendre (déterminé selon la norme NF M 03-003, AFNOR, 1994) sont respectivement de $4,49 \pm 0,35$ % (m/m) et de $4,99 \pm 0,14$ % (m/m). Ces résultats sur la composition sont conformes à ceux transmis par le fournisseur. La courbe de solubilité dans l'eau des caséinates de sodium en fonction du pH a été déterminée (**Figure 4.1**).

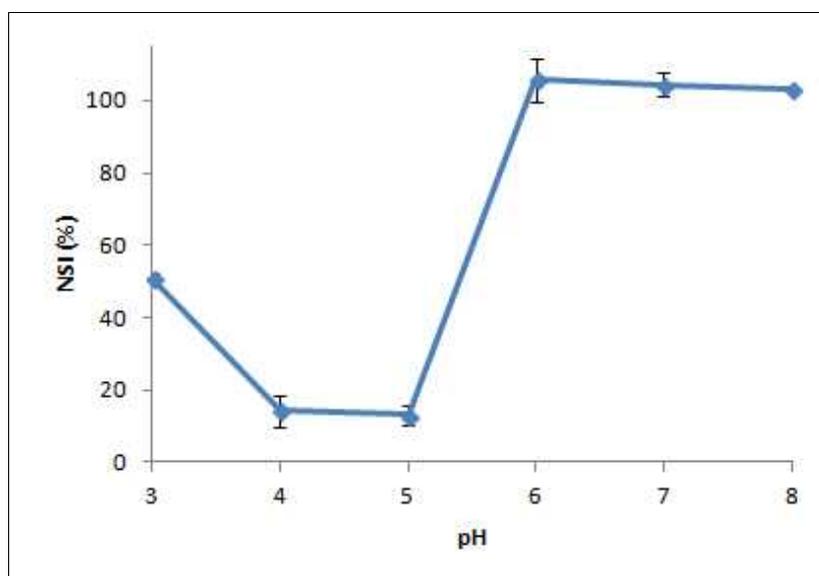


Figure 4.1 Profil de solubilité (solubilité de l'azote, « Nitrogen Solubility Index » (NSI)) des caséinates de sodium dans l'eau en fonction du pH pour une suspension à 0,5 % (m/m) à 25°C.

Le minimum de solubilité est atteint entre le pH =4 et le pH = 5 (aux alentours du pI des caséinates qui est de 4,5). La solubilité des protéines dépend de la balance de charge de surface entre les groupements $-NH_3^+/-NH_2$ et $-COOH/-COO^-$ de pKa 9,8 et 4,2 respectivement. Lorsqu'une protéine

est réhydratée, l'eau se fixe en premier sur les résidus chargés puis, sur les résidus polaires non ionisés puis, sur les liaisons peptidiques (Snappe *et al.*, 2010). En modifiant le pH, la charge de la protéine est changée, or les résidus d'acides aminés fixent 2 à 3 fois plus d'eau quand ils sont ionisés (Snappe *et al.*, 2010). Le nombre de charge à pH = 7 est en effet plus important qu'à pH = 3 donc le nombre de groupements fixant en priorité les molécules d'eau est plus conséquent à la neutralité qu'à pH acide. Au point isoélectrique, l'égalité des charges négatives et positives conduit généralement à une solubilité minimale.

Pour l'alginate de sodium, la composition en eau et le taux de cendre sont respectivement de $7,59 \pm 1,65$ % (m/m) et de $25,91 \pm 1,66$ % (m/m) à 25°C.

4.1.2 Analyse RMN¹H de l'alginate

L'analyse RMN¹H permet de quantifier les différentes fractions en monomères et dimères mannuroniques (M) et guluroniques (G) pour un alginate donné. Pour permettre les analyses en RMN avec un temps de relaxation du proton raisonnable, il a fallu abaisser la viscosité de la solution d'alginate. Le polyside a donc été partiellement hydrolysé en milieu acide. Les chaînes obtenues sont alors plus courtes mais elles conservent un degré de polymérisation suffisant pour rendre compte du produit de départ.

Les signaux intéressants pour l'analyse structurale des alginates concernent les protons en position 1 et 5 sur les cycles pyraniques dont l'environnement varie selon la conformation et donc l'enchaînement des unités uroniques.

Le spectre présenté **Figure 4.2** a été obtenu pour l'alginate utilisé dans cette étude. L'intégration des pics permet de calculer les différentes fractions en monomères et dimères de l'alginate utilisé selon les formules présentées dans la partie matériels et méthodes correspondante. Pour décrire les chaînes de polysides, plusieurs paramètres peuvent être calculés à partir de ces fréquences monomériques et dimériques (**Figure 4.2**) :

- $\eta = \frac{F_{MG}}{(F_M * F_G)}$ représente l'organisation des chaînes :
 - si $0 < \eta < 1$, le polymère est dit à blocs (MMMMGGGMMMMGGG) ;
 - si $\eta = 1$, le polymère est dit statistique (répartition aléatoire des monomères) ;
 - si $1 < \eta < 2$, le polymère est dit alterné (MGMGMG) ;
- N_G et N_M , représentent le nombre moyen, respectivement, d'unités G et M dans un bloc de type, respectivement, G et M (Agulhon, 2012).

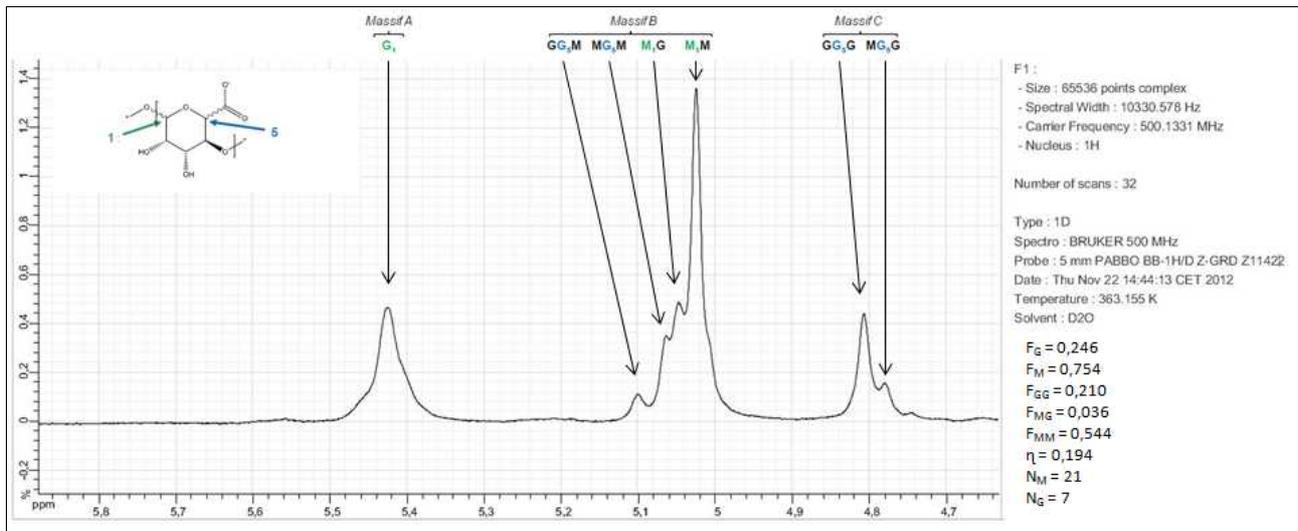


Figure 4.2 Spectre RMN¹H dans D₂O à 90°C de l'alginate de sodium (Fisher Scientific, Hampton, Hampshire, États-Unis) pré-hydrolysé.

D'après le rapport M/G, l'alginate est riche en unités M (75 %). Le paramètre η qui est égal à 0,194 donc inférieur à 1, permet de renseigner sur la structure de notre alginate. Cet alginate est formé de blocs d'unités mannuroniques s'alternant avec des blocs d'unités guluroniques. Chaque bloc d'unités mannuroniques est composé d'environ 21 monomères M (N_M) et chaque bloc d'unités guluroniques est composé environ de 7 monomères G (N_G).

Ces données structurales pourront être exploitées pour discuter des données de microstructures obtenues pour les systèmes gélifiés sous forme de billes. En effet, les propriétés d'un gel d'alginate dépendent des fréquences des blocs M et G mais aussi de la longueur de ces blocs.

4.1.3 Mesure du potentiel Zêta

Les répulsions électrostatiques sont généralement les forces principales qui gouvernent les interactions ségréatives entre deux molécules chargées en solution aqueuse (Tolstoguzov, 1995 ; Norton et Frith, 2001 ; Ducelet *et al.*, 2004). Les potentiels Zêta d'une solution de caséinate de sodium et d'une solution d'alginate de sodium ont donc été mesurés en fonction du pH (**Figure 4.3**).

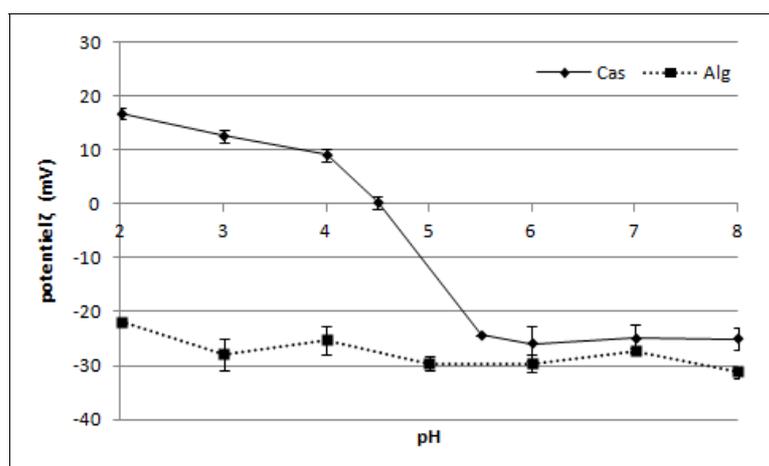


Figure 4.3 Potentiel Zêta d'une solution de caséinate de sodium (à 0,001 % (m/m)) et d'une solution d'alginate de sodium (à 0,005 % (m/m)) en fonction du pH dans un tampon imidazole/acétate à 5 mmol.L⁻¹ à 25°C (n=3).

Entre pH = 8 et pH = 4, la charge globale des caséinates de sodium est successivement négative, nulle et positive variant de -25 à 9 mV alors que la charge de l'alginate est toujours négative variant de -31 à -25 mV, ce qui est logique compte tenu du caractère purement anionique de l'alginate ($pK_{aG} = 3,65$; $pK_{aM} = 3,38$ (Liu *et al.*, 2003)). Le point isoélectrique des caséinates associé à un potentiel zêta nul est d'environ 4,5. Cette valeur est concordante avec les données de la littérature qui rapportent un pI entre 4,4 et 5,2 (Harnsilawat *et al.*, 2006). Les deux polymères sont chargés globalement de la même charge négative entre pH = 8 et pH = 5, les interactions sont donc répulsives pouvant être à l'origine d'une séparation ségrégative en solution. Celle-ci a été mise en évidence en réalisant le diagramme de phases du système.

4.2 Comportement des mélanges

4.2.1 Diagramme de phases partiel obtenu par observation macroscopique à pH = 7 et 25°C

Le diagramme de phases présenté **Figure 4.4** a été établi par l'observation macroscopique du déphasage accéléré par centrifugation. Les deux biopolymères sont peu miscibles et les mélanges se séparent en une phase riche en alginate (phase supérieure) et une phase riche en caséinate (phase inférieure). La séparation de phase est observable pour des concentrations en alginate et en caséinate respectivement supérieures à 0,5 % (m/m) et 5 % (m/m). L'apparition de deux phases distinctes après la centrifugation est due aux interactions entre polyosides et protéines : interactions

électrostatiques, hydrophobes et/ou exclusion de taille. Ces systèmes sont caractérisés par des forces répulsives entre les chaînes de protéines et de polysides qui ne permettent pas l'association entre deux molécules de polymères différents. Il y a plutôt exclusion des molécules non semblables créant cette séparation de phase gouvernée par l'incompatibilité thermodynamique (Norton et Frith, 2001).

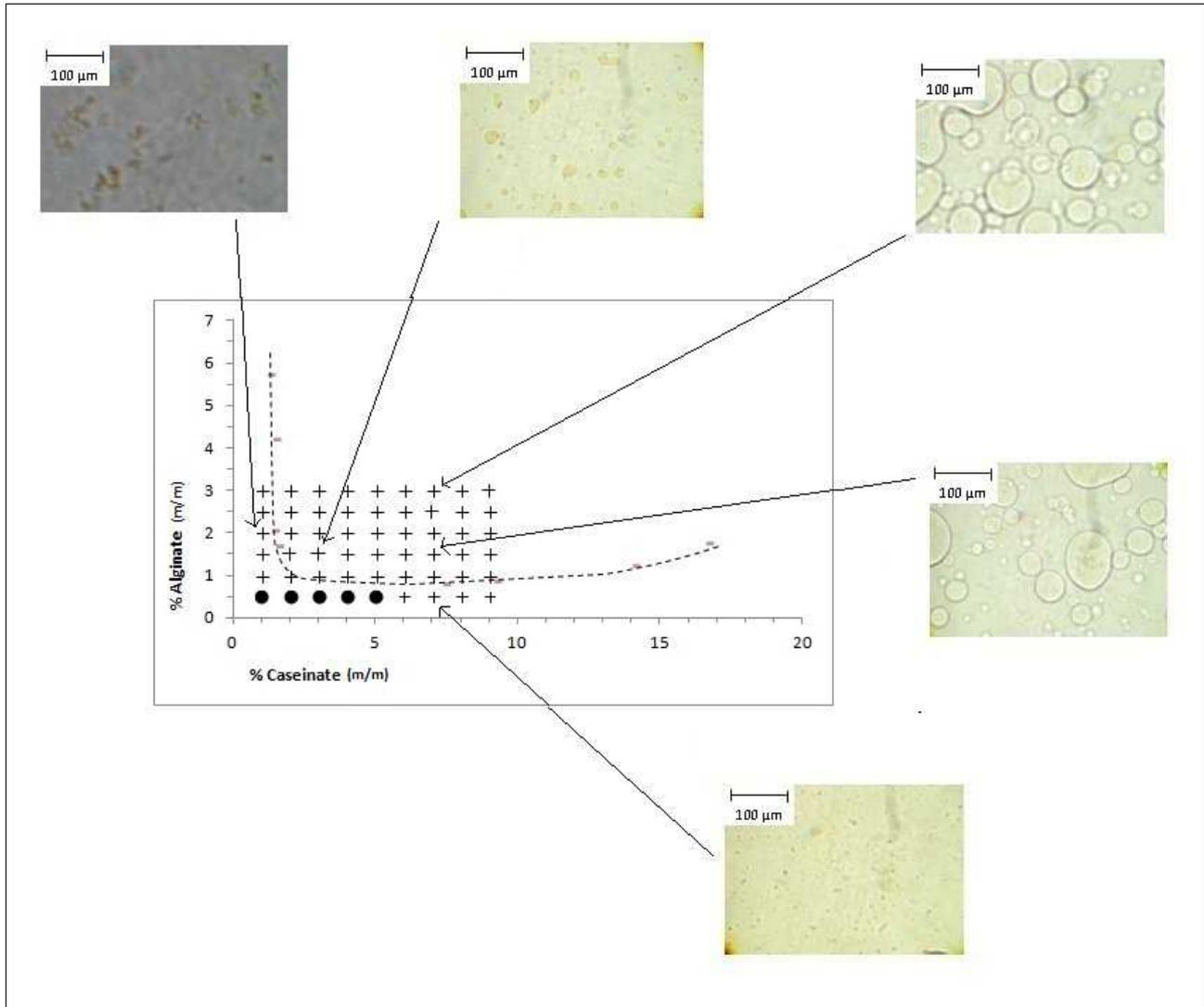


Figure 4.4 Diagramme de phases visuel du système alginate de sodium / caséinate de sodium à pH = 7 (+ séparation de phase, • mélange monophasique), à 25°C.

La courbe binodale de la Figure 4.5 est reportée en pointillée.

Observations en microscopie confocale (Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, Allemagne)).

Ce premier diagramme de phases est en accord d'un point de vue qualitatif avec d'autres études précédentes concernant les systèmes alginate de sodium/caséinate de sodium (Blonk *et al.*, 1995 ; Capron *et al.*, 2001 ; Simeone *et al.*, 2004 ; Antonov et Friedrich, 2007). Néanmoins, les

comparaisons quantitatives sont rendues difficiles du fait des différences de sources des biopolymères (différences de la distribution des masses moléculaires, de structures) et des concentrations en sels. Pour la suite de l'étude, des mélanges ont été sélectionnés dans la zone d'incompatibilité. Les teneurs en protéine ont alors été mesurées par la méthode de Kjeldahl puis, les teneurs en alginate ont été déterminées par différence par la méthode des masses sèches. La courbe binodale a donc été déterminée plus précisément.

Les observations microscopiques montrent des microstructures de type émulsion pour les mélanges de compositions placées à l'intérieur de la binodale. Des observations microscopiques en marquant la phase protéique permettront par la suite de déterminer le polymère formant la phase continue et celui formant la phase dispersée (4.3.1.1). Pour les deux compositions proches des axes, un polymère est largement majoritaire et des particules du polymère majoritaire sont néanmoins visibles.

4.2.2 Influence du pH sur le comportement des mélanges

Le pH est un paramètre clé entrant en jeu pour les interactions entre polymères. Les interactions inter-moléculaires peuvent effectivement être affectées par la protonation des polymères, la solubilité et l'hydratation des macromolécules (Antonov et Friedrich, 2007). Trois diagrammes ont été déterminés à trois valeurs de pH : 7,0 ; 6,0 et 5,5 (**Figure 4.5**). A pH = 7, la forme de la découpe entre les zones de compatibilité et d'incompatibilité est typique des séparations de phase ségrégatives en forme de U (Tolstoguzov, 1995). La binodale à pH = 7 a été reportée sur la **Figure 4.4** (diagramme macroscopique) montrant que des mélanges présentant apparemment une séparation de phase sont au final dans la zone de miscibilité définie par cette binodale. Une séparation de phase incomplète des mélanges choisis pour construire la binodale pourrait expliquer ce résultat. Ce phénomène a déjà été mis en évidence pour des mélanges fortement concentrés (Mession *et al.*, 2012). Pour des raisons de viscosité élevée des systèmes polymériques, les mélanges ne se séparent pas complètement et l'équilibre n'est pas atteint.

Le pH semble affecter significativement l'allure des diagrammes. Quand le pH diminue et s'approche du pI des caséinates (4,6), la binodale s'éloigne des axes indiquant une séparation de phase moins nette. De plus, l'aire de la zone d'incompatibilité est plus importante à pH = 7 qu'à pH = 5,5 : l'incompatibilité augmente avec le pH.

Les données de la littérature sur l'influence du pH sur l'incompatibilité du système alginate/caséinate sont rares. Néanmoins, le même comportement a été reporté par Grinberg et

Tolstoguzov (1997) concernant des systèmes dextran/globuline ou gomme arabique/globuline pour des pH supérieurs à 7. Une augmentation de la zone d'incompatibilité a été observée entre pH = 8 et 10. Il reste difficile de tirer des règles générales puisque les conditions d'incompatibilité dépendent de la paire de polymères et de leurs conformations (qui sont très différentes entre les caséinates et les globulines).

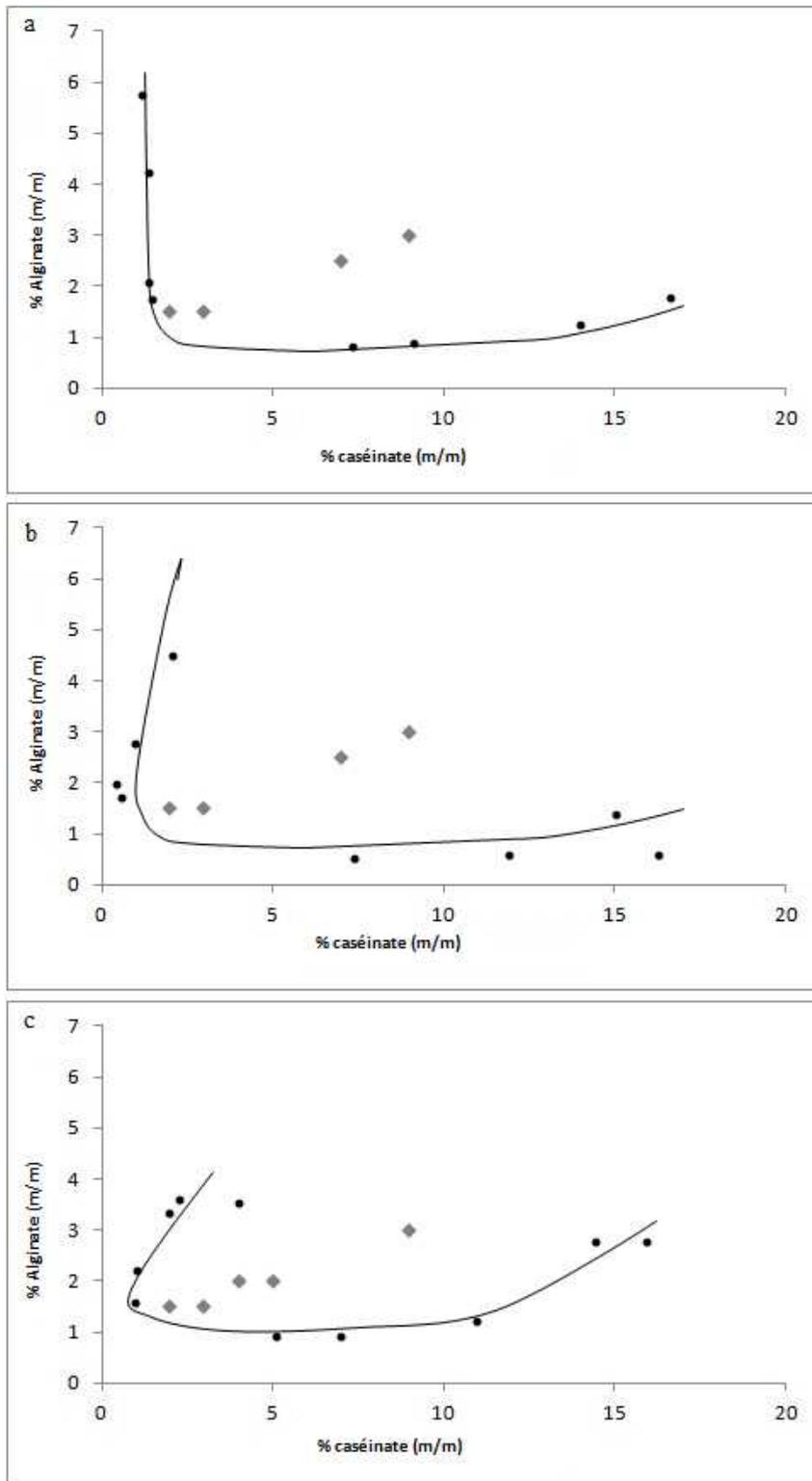


Figure 4.5 Diagramme de phases des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium à pH = 7,0 (a), 6,0 (b) et 5,5 (c), à 25°C.

◆, composition des mélanges initiaux.

●, composition des phases riches en un polymère après la séparation de phase des mélanges initiaux.

4.2.3 Influence de l'ajout de MRS_b

D'après l'étude bibliographique, la production d'actifs antimicrobiens par les LAB est liée à la concentration cellulaire dans le milieu par une régulation de type « Quorum Sensing ». L'un des intérêts qui a guidé pour l'ajout de caséinates dans le système a été un possible apport en composés azotés pour le métabolisme des LAB. En effet, certaines espèces, notamment *Lactococcus lactis* spp., possèdent une activité protéolytique qui leur permet de métaboliser des protéines comme par exemple la caséine. Pour des raisons analogues concernant la survie, voire le développement cellulaire, l'ajout du milieu nutritif MRS_b a été évalué pour un mélange type : alginate de sodium (1,5 % (m/m)) + caséinate de sodium (4 % (m/m)).

La cultivabilité et l'activité antimicrobienne des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 confinées dans des mélanges aqueux polymériques biphasiques alginate de sodium/caséinate de sodium non gélifiés et gélifiés (sous forme de billes) avec ajout ou non de milieu nutritif MRS_b (20 % (m/m)) ont été mesurées (**Figure 4.6**).

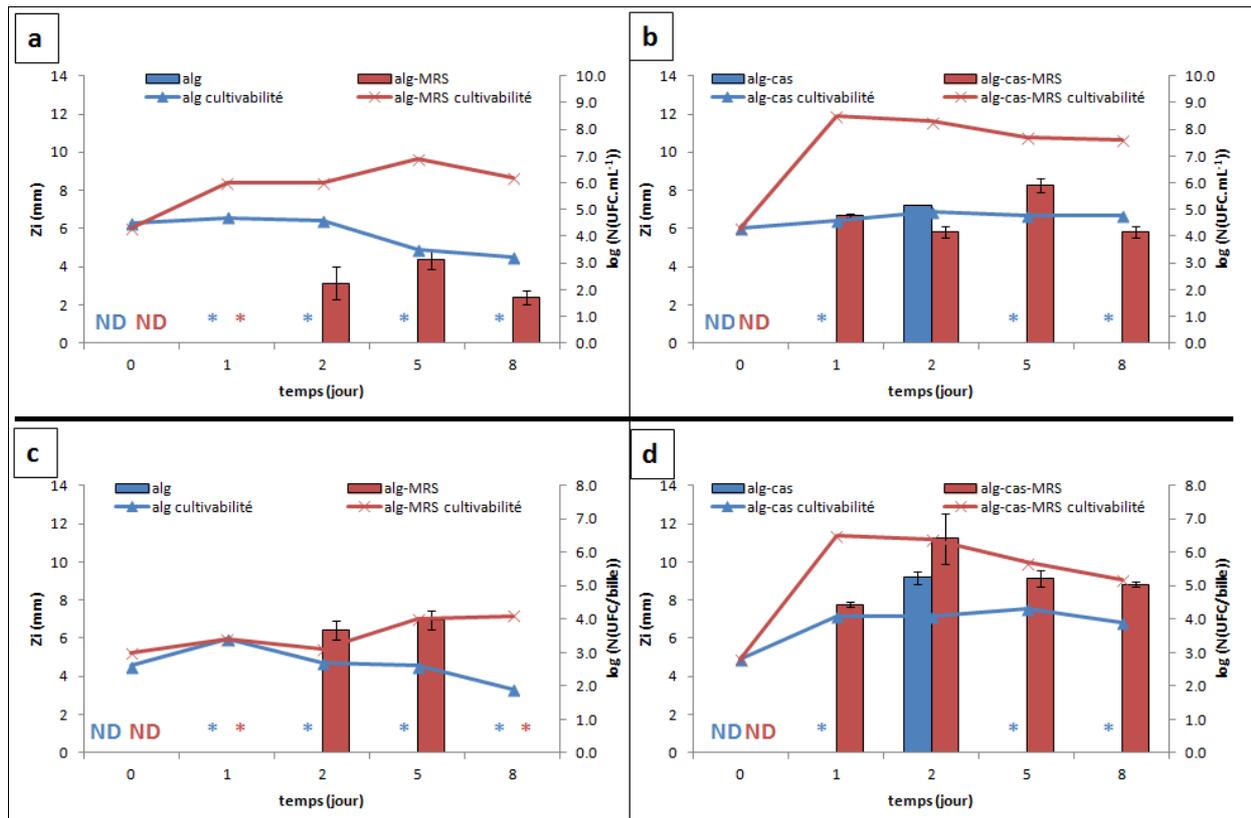


Figure 4.6 Activité antimicrobienne anti-*Listeria innocua* LRGA01 et cultivabilité des cellules de LAB3 (charge initiale en LAB3 : C2, 10⁴ UFC.mL⁻¹ de mélange polymérique ; stockage 8 jours à 30°C) confinées dans :
 (a) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) liquide avec ou sans MRS_b (20 % (m/m))
 (b) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) + caséinate de sodium (4 % (m/m)) liquide avec ou sans MRS_b (20 % (m/m))
 (c) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) gélifié (billes) avec ou sans MRS_b (20 % (m/m))
 (d) alginate de sodium (1,5 % (m/m)) + caséinate de sodium (4 % (m/m)) gélifié (billes) avec ou sans MRS_b (20 % (m/m))

ND : non déterminé ; * : aucune zone d'inhibition.

Dans un premier temps, il est à noter que les différents mélanges sans cellules de LAB n'ont pas donné d'activité antimicrobienne (résultats non montrés). Pour chaque expérimentation de ce type, les témoins sans cellules ont été réalisés pour s'assurer de ce point.

Pour les formulations avec alginate seul ou alginate/caséinate, gélifiées ou non gélifiées, les cellules de LAB3 ont montré une meilleure cultivabilité en présence de MRS_b de plus de 1 log par mL ou par bille, suivant les cas, à 8 jours à 30°C. Par exemple, les cellules de LAB3 se maintiennent du jour 1 à 8 à environ 10⁸ UFC.mL⁻¹ dans alg/cas/MRS_b liquide et seulement à 10⁵ UFC.mL⁻¹ dans alg/cas liquide sans MRS_b (**Figure 4.6.b**). De plus, les activités anti-*Listeria* ont été mises en

évidence principalement pour les mélanges contenant du MRS_b et celles-ci sont restées régulières du jour 1 au jour 8. Brachkova *et al.*, en 2010, ont également ajouté du milieu MRS_b dans des billes d'alginate pour immobiliser des cellules de lactobacilles bioprotectrices. L'activité antimicrobienne de ces cellules immobilisées en présence de MRS_b contre *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* a été améliorée : le nombre de cellules de lactobacilles nécessaire pour une inhibition a été réduite de 1 à 2 log d'UFC par rapport à des billes sans MRS_b. L'influence de l'ajout de MRS_b s'est même révélé encore plus importante pour l'activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa* : le nombre de cellules de lactobacilles nécessaire pour une inhibition a été réduit de 3 à 4 log d'UFC par rapport à des billes sans MRS_b.

A la vue de nos résultats, il s'est avéré primordial d'apporter des éléments nutritifs dans le système de confinement des cellules de bactéries lactiques afin d'obtenir une activité de biopréservation significative. Cet effet de la présence du milieu nutritif sur la croissance et sur l'activité antimicrobienne est renforcé en présence des caséinates. En effet, les caséinates peuvent être une autre source de nutriments puisque certaines espèces de LAB et notamment *Lactococcus lactis* possèdent un mécanisme protéolytique membranaire leur permettant de métaboliser des peptides de taille importante (Salminen et Von Wright, 2009).

Du milieu MRS_b a donc été additionné au système à 20 % (m/m). D'un point de vue physico-chimique, l'ajout d'un autre composé au mélange aqueux biphasique alginate de sodium/caséinate de sodium peut modifier l'équilibre du système. Le milieu MRS_b contenant des sources protéiques, il a été impossible de déterminer un nouveau diagramme de phases. De plus, le bouillon MRS_b apportant une forte coloration, il s'est avéré aussi très difficile de distinguer visuellement la séparation de phase. Pour comparer le comportement de phase du système en présence ou en absence de MRS_b, une technique de diffusion multiple de la lumière a été mise en œuvre permettant de suivre l'évolution des systèmes colloïdaux d'un point de vue macroscopique à l'état liquide (Turbiscan™).

Cette méthode a été développée au cours de la décennie 1990 (Mengual *et al.*, 1999). Certains chercheurs l'utilisent depuis pour la caractérisation du comportement de mélanges de polymères (Chauvierre *et al.*, 2004 ; Mandala *et al.*, 2004 ; De la Salles *et al.*, 2005).

Sur la **Figure 4.7**, deux profils de rétrodiffusion de la lumière sur la hauteur de l'échantillon sont représentés en fonction du temps (jusqu'à 24h) pour une même formulation avec ou sans MRS_b en prenant le profil à $t = 0$ h comme référence, c'est-à-dire juste après mélange des constituants.

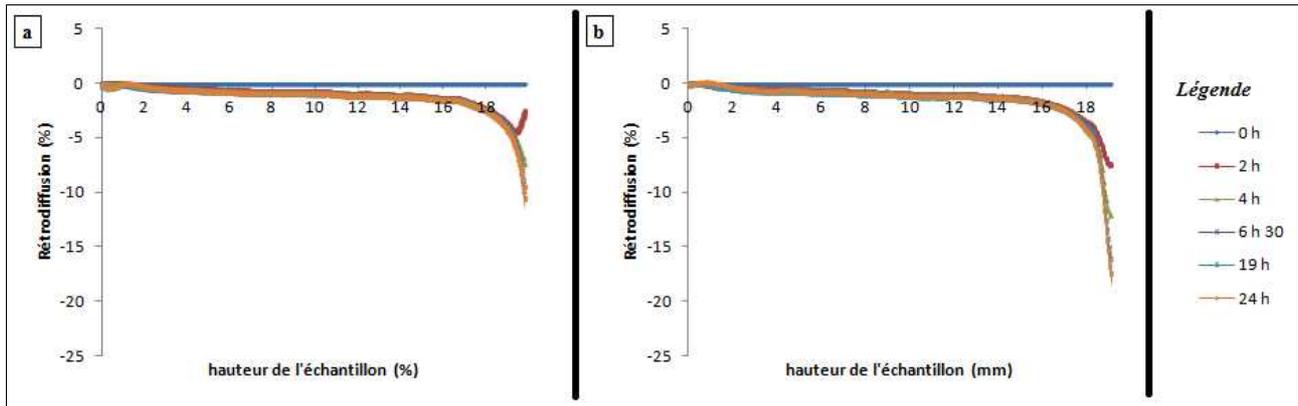


Figure 4.7 Influence de l'ajout de MRS_b sur l'équilibre des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium d'un point de vue macroscopique : profils de rétrodiffusion (R) sur 24 h à 25°C en diffusion multiple de la lumière (Turbiscan™) du mélange (a) 1,5 % (m/m) alginate de sodium + 4 % (m/m) caséinate de sodium ; (b) 1,5 % (m/m) alginate de sodium + 4 % (m/m) caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Ces deux profils de turbidité ont permis de mettre en évidence une zone de clarification en haut de l'échantillon, une diminution de la rétrodiffusion indiquant une plus faible dispersion. Comme déjà indiqué, ce phénomène de clarification en haut du tube est donc dû au phénomène de déphasage. Le mélange se sépare en une phase riche en caséinate (phase inférieure) et une phase riche en alginate (phase supérieure). La phase alginate laisserait donc mieux diffuser la lumière, diminuant ainsi le pourcentage du faisceau rétrodiffusé. En mesurant la hauteur et la largeur du pic de rétrodiffusion en fonction du temps (R(t)), il est possible de mesurer la vitesse de migration du front de clarification qui correspond à la pente initiale de cette courbe (Chauvierre *et al.*, 2004).

Le **Tableau 4.1** répertorie les valeurs des pentes initiales des courbes R(t) pour quatre formulations avec ou sans MRS_b. Pour l'ensemble des échantillons, le maximum de rétrodiffusion dans la zone de clarification (haut du tube) est atteint après environ 7h.

Tableau 4.1 Vitesse de déphasage par sédimentation de la phase protéique pour différents mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium avec ou sans MRS_b obtenu d'après les profils de rétrodiffusion en diffusion multiple de la lumière (Turbiscan™).

Composition des mélanges initiaux (%) m/m))		Pente de Delta R(t) entre 0 et 7 h (%.h ⁻¹)	
Alginate	Caséinate	Sans MRS _b	Avec MRS _b (20 % (m/m))
1,5	2	-0,46	-0,45
3	2	-0,46	-0,50
1,5	4	-1,07	-1,12
1,5	9	-0,49	-0,31

Pour une formulation donnée, la différence de vitesse de migration du front de clarification (donc du déphasage) n'est pas significative en ajoutant ou non du milieu MRS_b. L'ajout du milieu MRS_b à 20 % (m/m) ne semble donc pas perturber les propriétés de déphasage macroscopiques des mélanges alginate de sodium/caséinate de sodium. Sosa-Herrera *et al.*, en 2012, ont également travaillé sur des analyses Turbiscan™ (Formulation, France) avec un mélange alginate de sodium/caséinate de sodium (0,1/2 % (m/m)) pour étudier la distribution en taille des particules après ajout de chlorure de calcium (5 mmol.L⁻¹). Ils ont montré, pour le mélange alginate de sodium/caséinate de sodium (0,1/2 % (m/m)) dans l'eau sans chlorure de calcium, une zone de clarification en haut de tube par une augmentation du pourcentage de lumière transmise. Cette tendance, également mise en évidence par nos résultats, donne une indication sur le mécanisme de déphasage. D'après cette étude macroscopique, le déphasage se fait par sédimentation des particules de caséinate sans floculation ou coalescence. En effet, s'il y avait l'un ou l'autre de ces mécanismes, cela provoquerait une diminution de la rétrodiffusion uniformément sur toute la hauteur de l'échantillon. La sédimentation est un phénomène rencontré lorsque la densité de la phase dispersée est supérieure à celle de la phase continue.

L'utilisation d'un milieu nutritif pour les cellules (MRS_b) semble nécessaire pour maximiser la cultivabilité et l'activité antimicrobienne des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 confinées dans les mélanges alginate/caséinate gélifiés et non gélifiés. D'un point de vue macroscopique, l'ajout de MRS_b ne semble pas perturber le comportement du mélange alginate/caséinate. L'influence de l'ajout du milieu MRS_b sur les mélanges d'alginate/caséinate a également été observée par la suite d'un point de vue microscopique.

4.3 Étude des microstructures

Dans l'objectif d'identifier une composition en alginate et en caséinate du système servant au confinement des bactéries lactiques, les microstructures de différents mélanges ont été observées en utilisant la microscopie confocale. Pour une composition type, les cellules ont été incorporées et leur localisation dans les systèmes liquides a été étudiée. Les systèmes ont par la suite été gélifiés et les réseaux d'alginate et de caséinate ainsi que la répartition des cellules dans les matrices ont été observés de la même façon que pour les systèmes liquides. Ces données de microscopie s'intéressant aux microstructures et à la localisation des cellules permettront de discuter des résultats sur le potentiel antimicrobiens de telles matrices (survie des cellules de LAB bioprotectrices, diffusion des actifs antimicrobiens).

4.3.1 Systèmes liquides

4.3.1.1 Microstructures et évolution cinétique

Plusieurs compositions en alginate et en caséinate ont été choisies dans la zone d'incompatibilité du diagramme de phases pour déterminer leur microstructure par microscopie. Celles-ci ont été reportées sur le diagramme de phases à pH = 7 de la **Figure 4.8** (points A, A1, A2, B, C, D). Les échantillons ont été préparés, à pH = 7 et à température ambiante, en marquant les caséinates avec la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC). Les zones riches en caséinate apparaissent en gris clair alors que les zones riches en alginate sont plus sombres. Un témoin correspondant à une solution de caséinate marquée à l'aide de la RITC est présenté **Figure 4.8** image (i). Les caséinates montrent une fluorescence uniforme. L'évolution de la microstructure a été suivie en fonction du temps pour les compositions où le pourcentage d'alginate était inférieur à 2 % (m/m). Au delà de 20 min, les structures étaient stables. Pour les mélanges avec un pourcentage en alginate supérieur (points C et D, **Figure 4.8**), les microstructures étaient stables dès 5 min en raison probablement de la viscosité élevée du mélange qui ralentit et bloque la séparation de phase. Pour chacune des compositions, les deux biopolymères sont distribués dans deux phases clairement distinctes l'une de l'autre.

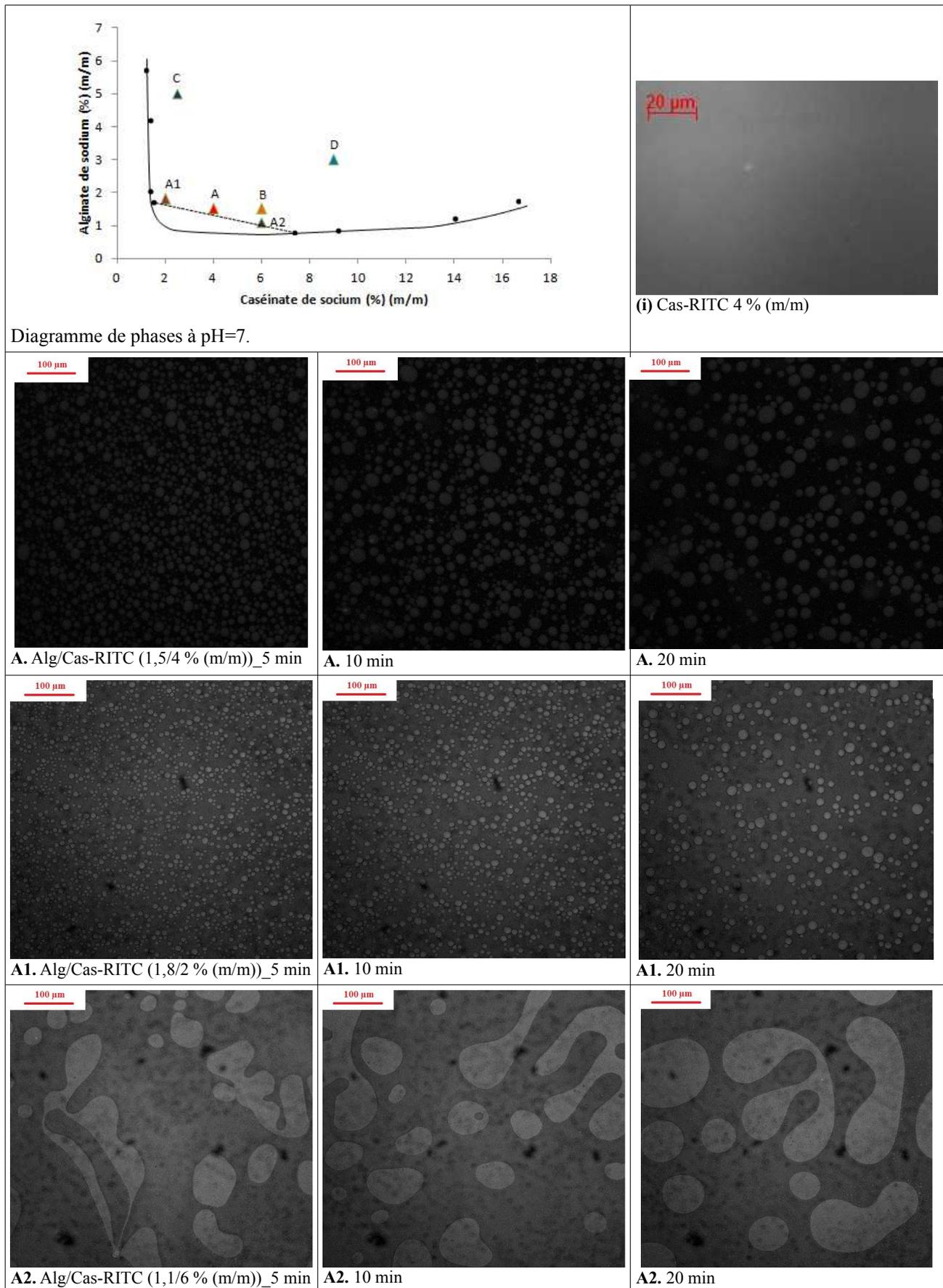
Deux mécanismes pour la séparation de phase ont été décrits (Butler et Heppenstall-Butler, 2003) :

- nucléation et croissance avec un état initial présentant une gamme aléatoire et polydispense de gouttes avec des interfaces nettes, évoluant par fusion des gouttelettes ;

- décomposition spinodale avec un état initial présentant une régularité des structures gouttelettes ou bi-continues en terme de taille et d'espace entre les structures mais dont la concentration s'accroît au cours du temps.

Les mélanges observés semblent tous avoir un état initial du type nucléation et croissance. Ces mélanges seraient donc dans la zone des mélanges métastables (Rediguieri *et al.*, 2007). Néanmoins, ils ont évolué de façons différentes au cours du temps. Avec une concentration en caséinate élevée (à partir de 6 % (m/m)) et un pourcentage d'alginate inférieur à 2 % (m/m), le système évolue vers une morphologie bi-continue. Pour les mélanges avec une concentration en caséinate moins importante, le système se compose d'une phase continue riche en alginate et une phase dispersée riche en caséinate. Les morphologies obtenues pour ces derniers mélanges sont de type émulsion. Capron *et al.*, en 2001, ont auparavant défini ce type de morphologie concernant les mélanges caséinate de sodium/alginate de sodium. De Kruif et Tuinier, en 2001, l'ont mis en évidence pour un autre type de mélanges, caséine/gomme de guar. Le modèle de microstructure, émulsion (gouttelettes) ou agrégation, dépend du type de polyside et de sa concentration minimale induisant une séparation de phase (Mession *et al.*, 2012).

Les mélanges A, A1 et A2 ont été choisis le long d'une droite de conjugaison pour pouvoir observer une inversion de phase. Le mélange A2 n'a pas permis d'obtenir un système ayant une phase continue de caséinates et une phase dispersée d'alginate mais seulement un système bi-continu. Lorsque que la concentration en protéine dans le mélange initial augmente, les microdomaines de protéine sont moins nombreux mais de tailles plus importantes. Musampa *et al.*, 2007 et Mession *et al.*, 2012, ont observé cette même tendance pour des mélanges, respectivement, de protéines de pois/carraghénane et protéines de pois/alginate de sodium. Pour d'autres systèmes évoqués dans la littérature, une inversion de phase a été observée : pectine/caséine (Rediguieri *et al.*, 2007), gélatine/maltodextrine et gomme de caroube/caséinate (Norton et Frith, 2001), protéine de pois et alginate de sodium (Mession *et al.*, 2012).



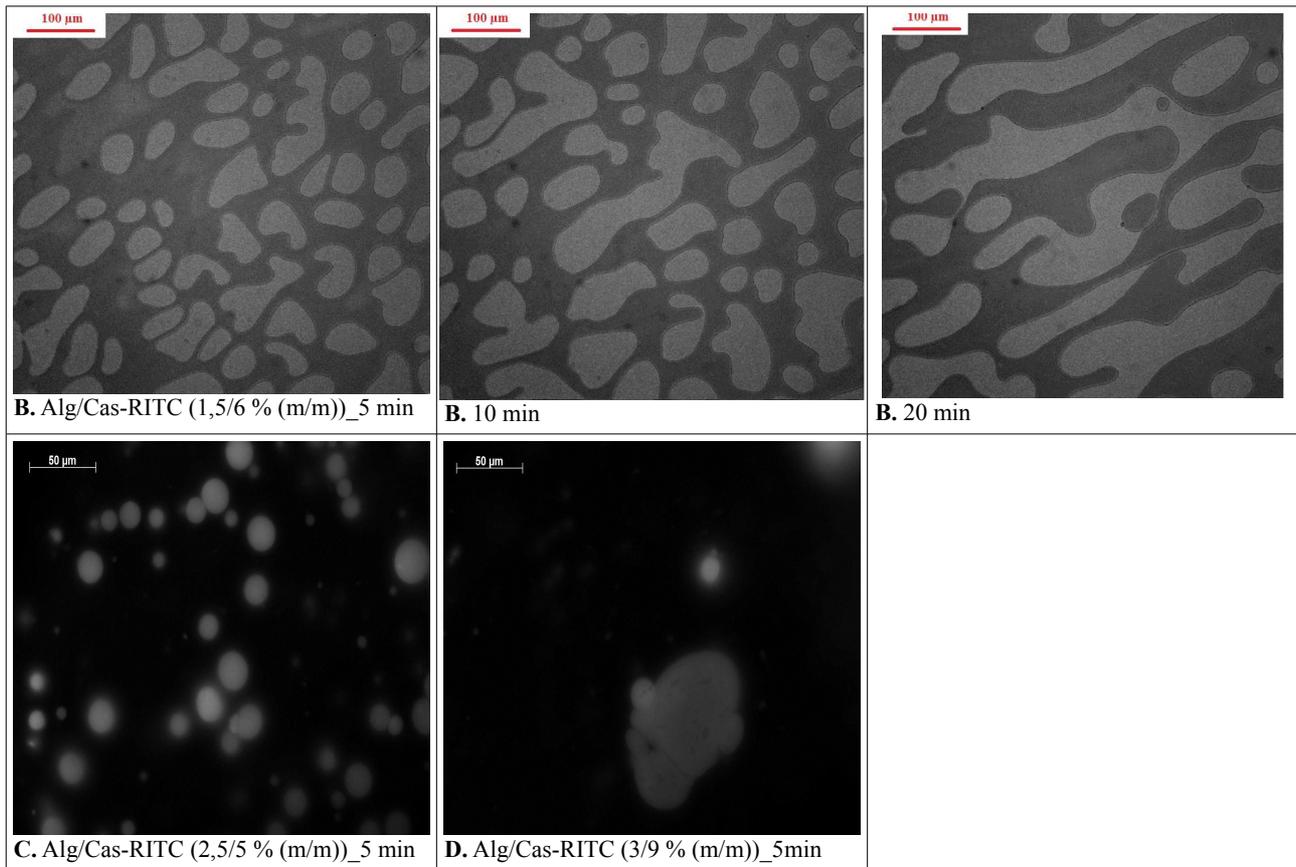


Figure 4.8 Microstructures des mélanges aqueux alginate de sodium/caséinate de sodium obtenues par microscopie confocale à pH = 7 à température ambiante. Les zones claires correspondent aux zones riches en caséinate marquées à la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC).

Observations en microscopie confocale (Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, Allemagne)).

4.3.1.2 Choix de la formulation de travail et influence du MRS_b sur la microstructure

Le choix du système pour confiner les bactéries s'est porté sur la composition suivante : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium. Ce choix du mélange a été effectué en fonction des critères suivants :

- une phase continue d'alginate pour permettre une gélification ;
- une structure régulière de la dispersion ;
- un déphasage relativement lent du système pour envisager une gélification lente par la suite.

Le mélange choisi a montré une microstructure de type émulsion avec une phase dispersée protéique et une phase continue d'alginate. La phase continue alginique va permettre de pouvoir

gélifier le système en utilisant les propriétés gélifiantes de l'alginate. Selon la localisation des cellules dans le système, les gouttelettes de caséinate pourraient servir de double protection des cellules de LAB bioprotectrices.

La **Figure 4.9** présente la microstructure du mélange choisi ainsi que de sa phase riche en alginate et de sa phase riche en caséinate après séparation de phase accélérée par centrifugation. La phase riche en alginate est composée à 1,71 % (m/m) d'alginate de sodium et à 2,12 % (m/m) de caséinate de sodium. Quant à la phase riche en caséinate, elle est composée de 0,54 % (m/m) d'alginate de sodium et de 5 % (m/m) de caséinate de sodium.

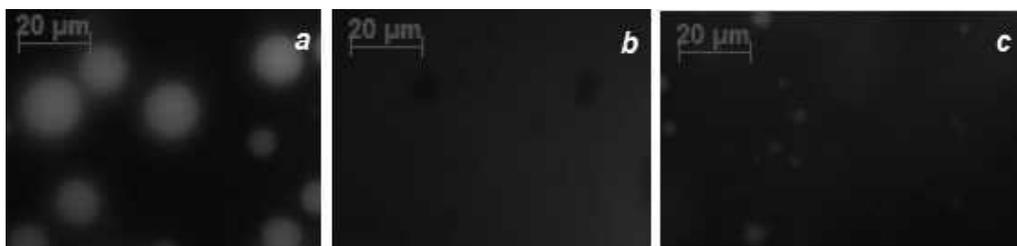


Figure 4.9 Mélange aqueux biphasique à 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium (a : mélange ; b : phase riche en caséinate ; c : phase riche en alginate). Les zones claires correspondent aux zones riches en caséinate marquées à la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC).

Sur les images b et c de la **Figure 4.9**, des inclusions d'alginate sont présentes dans la phase riche en caséinate et inversement. Le système étant visqueux, il semblerait que la séparation ségrégative ne soit pas totalement complète. Ce phénomène a été discuté précédemment (paragraphe 4.2.2) pour le tracé de la binodale. Ce phénomène de séparation incomplète a précédemment été mis en évidence par Mission *et al.* (2012) pour des mélanges fortement concentrés.

Comme discuté précédemment (paragraphe 4.2.3), du milieu nutritif pour les bactéries lactiques a été ajouté à ce mélange de confinement pour optimiser la survie des cellules et leur production d'actifs antimicrobiens. D'après les analyses réalisées en diffusion multiple de la lumière (TurbiscanTM), le comportement macroscopique de déphasage des mélanges n'est pas perturbé de façon significative par l'ajout de MRS_b. La **Figure 4.10** montre la même tendance quant à la microstructure. L'ajout de MRS_b ne change pas la microstructure du système : une phase continue d'alginate et une phase dispersée de caséinate avec une taille des gouttelettes de caséinate conservée par rapport à un mélange sans MRS_b.

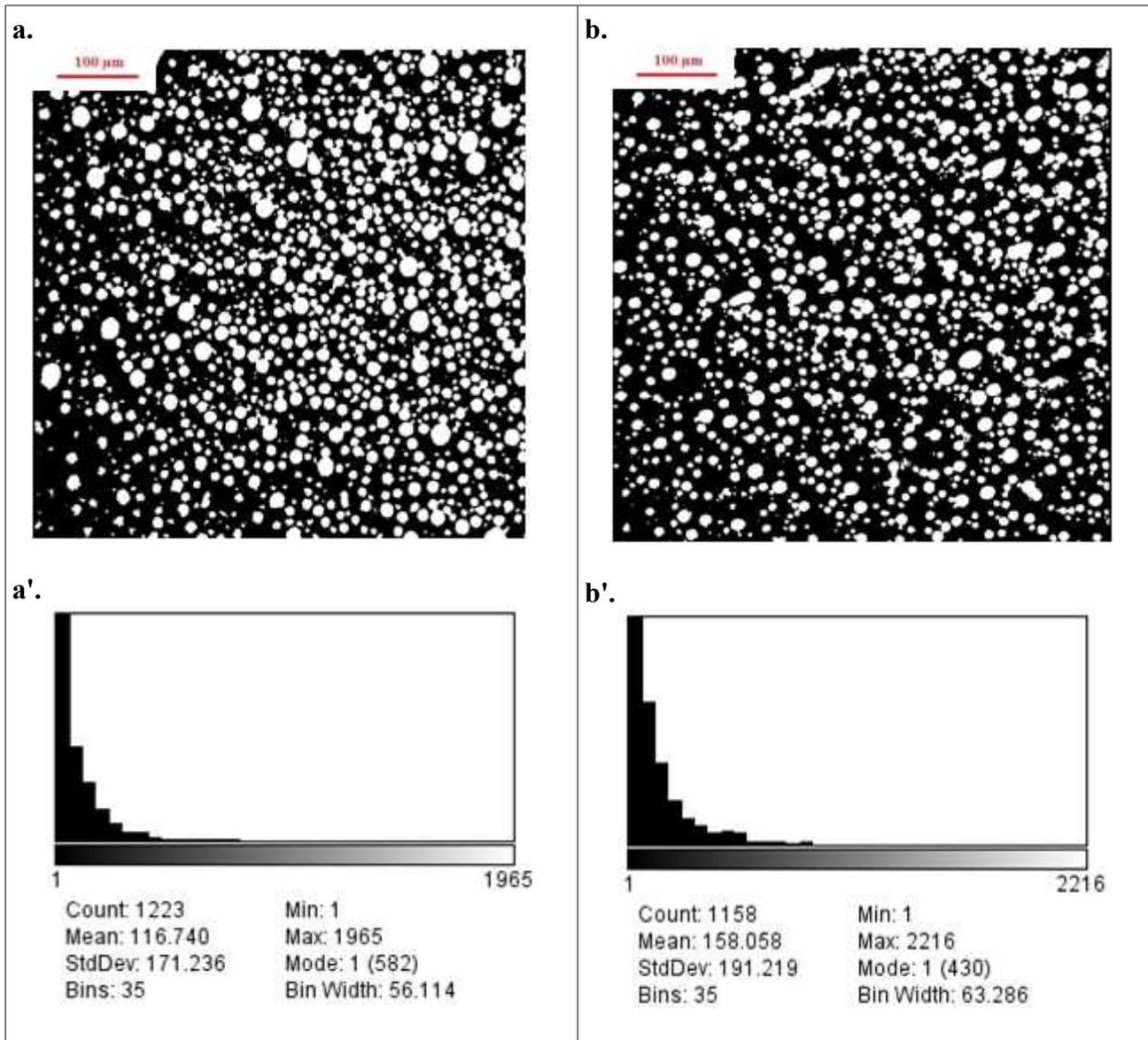


Figure 4.10 Microstructures et distributions en taille (en μm^2) des microgouttelettes des mélanges aqueux biphasiques à 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium (**a**, **a'**) et 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % (m/m) MRS_b (**b**, **b'**). Les zones claires correspondent aux zones riches en caséinate marquées à la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC).

Observations en microscopie confocale (Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, Allemagne)). L'analyse d'image a été réalisée avec le logiciel Image J.

Les cellules de LAB bioprotectrices ont alors été incorporées à ce mélange (1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % (m/m) MRS_b). La localisation des cellules a été étudié dans les systèmes polymériques liquides puis gélifiés (sous forme de billes) par deux outils microscopiques (confocale et MEB) en marquant à la fois les cellules et la phase

protéique pour les observations en confocale.

4.3.1.3 Localisation des cellules de LAB

L'adhésion de cellules bactériennes à une surface ou à une phase organique est principalement liée à leurs propriétés de surface (Ly *et al.*, 2006a/b ; Ly *et al.*, 2008a/b). Les interactions non spécifiques, comme les interactions hydrophobes ou électrostatiques, sont généralement impliquées dans ce type de mécanisme d'adhésion. Ces propriétés sont liées à la composition de la paroi cellulaires ainsi qu'aux conditions de culture et à l'âge de la culture (Palmer *et al.*, 2007). Dans cette étude, le caractère acide/base (au sens de Lewis) et le caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des cellules des souches de LAB1, LAB2 et LAB3 ont été déterminés en utilisant la méthode MATS (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). La charge de surface a, quant à elle, été déterminée par mesure de la mobilité électrophorétique (Potentiel Zêta).

4.3.1.3.1 Caractéristiques physico-chimiques des souches de LAB d'intérêts

La méthode MATS (d'après Bellon-Fontaine *et al.*, 1996) permet de déterminer le caractère acide/base (au sens de Lewis) et le caractère hydrophobe/hydrophile de la surface de cellules microbiennes. Elle compare les affinités des cellules pour deux solvants monopolaires : acide (accepteur d'électrons), le chloroforme et basique (donneur d'électrons), l'éther ; et deux solvants apolaires, l'hexane et l'hexadécane, tous deux ayant les mêmes composantes de Van Der Waals. Le caractère donneur d'électrons (base de Lewis) des cellules microbiennes est déterminé par la comparaison de l'affinité des cellules avec le chloroforme (acide, accepteur d'électrons) et l'hexadécane (apolaire). Si la différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme et celui à l'hexadécane est positive, le caractère des souches étudiées est jugé basique. En outre, le caractère accepteur d'électrons (acide de Lewis) des microorganismes est déterminé en comparant le pourcentage d'adhésion à l'éther (basique, donneur d'électrons) et à celui de l'hexane (apolaire) ; si la différence d'affinité est positive, le caractère des souches étudiées est jugé acide (Chadeau, 2011). Les affinités des cellules de LAB1, LAB2 et LAB3 pour les quatre solvants sont présentées dans la **Figure 4.11**.

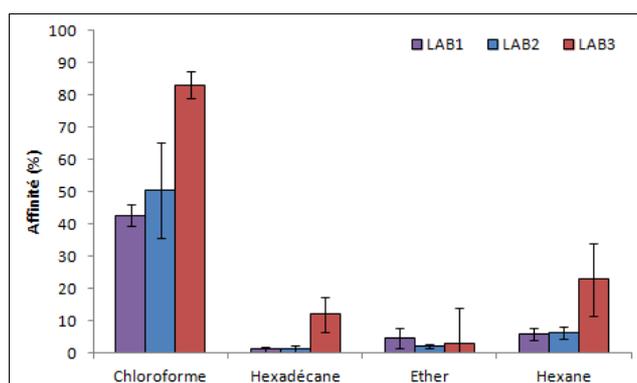


Figure 4.11 Affinité des cellules de LAB1, LAB2, LAB3 vis-à-vis de quatre solvants d'après la méthode MATS (« Microbial Adhesion To Solvents ») (n=3).

D'après ces résultats, ces trois souches ont une forte affinité au chloroforme ($A > 20\%$ (Chadeau, 2011)). La surface des cellules de LAB1, LAB2, LAB3 montrent un caractère hydrophile clair avec des pourcentages d'affinité avec les solvants apolaires inférieurs à 50 % :

- pour LAB1 et LAB2 : de l'ordre de 1 % pour l'hexadécane et de 6% pour l'hexane ;
- pour LAB3 : de l'ordre de 11 % pour l'hexadécane et de 22 % pour l'hexane.

Malgré des affinités relativement plus importantes pour la souche LAB3 avec le chloroforme, l'hexadécane et l'hexane par rapport aux souches LAB1 et LAB2, les souches LAB1, LAB2, LAB3 ont globalement les mêmes propriétés de surface d'après les normes instaurées pour l'interprétation décrites précédemment pour le chloroforme et les solvants apolaires (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

De plus, la différence d'affinité entre le chloroforme (solvant monopolaire acide) et l'hexadécane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère électron donneur (caractère basique au sens de Lewis) de ces trois souches bactériennes, puisque les composantes de Van Der Waals de ces deux solvants sont identiques (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Les résultats obtenus montrent que la surface des cellules des bactéries LAB1, LAB2, LAB3 sont de puissants donneurs d'électrons (base au sens de Lewis) : $A(\text{chloroforme}) - A(\text{hexane}) > 0$ et $A(\text{éther}) - A(\text{hexane}) < 0$.

Giaouris *et al.*, en 2009, ont testé 50 souches de *Lactococcus lactis* pour déterminer leurs propriétés de surface en utilisant la méthode MATS (solvants : chloroforme et hexadécane). Ils ont montré une grande variabilité entre les différentes souches pour l'affinité avec l'hexadécane. Ils ont expliqué cela par une possible incidence de l'origine des souches (animale, végétale, humaine). Néanmoins, la plupart des souches testées ont une surface avec une propriété hydrophile claire (affinité avec l'hexadécane inférieure à 40 %). Les trois souches testées LAB1, LAB2, LAB3 donnent la même réponse. De plus, les surfaces de la majorité du pool de 50 souches testées par Giaouris *et al.* (2009) ont montré un caractère de donneur d'électron, résultat aussi trouvé pour les

trois souches LAB1, LAB2, LAB3. Cette propriété de basicité au sens de Van Der Waals a aussi été rapportée par Ly *et al.* (2006b) sur 20 souches de *Lactococcus lactis* avec également une surface hydrophile. Giaouris *et al.* (2009) ont remarqué que la surface hydrophile de leurs souches avaient une concentration en polysaccharides deux fois plus élevée que la concentration en protéines. Ils ont expliqué que le caractère hydrophile des surfaces était à corréluer avec la concentration en azote ou en carbone et était inversement proportionnel à la concentration en oxygène de la paroi cellulaire externe. Par ailleurs, le caractère électron-donneur d'une souche peut être attribué à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire, comme les groupements carboxylates (COO^-) et phosphates (PO_4^-) des phospholipides, les lipoprotéines et les lipopolysaccharides ou les fonctions amines (NH_2) (Boonaert et Rouxhet, 2000). Les groupements carboxylates et phosphates joueraient donc un rôle prédominant dans la détermination de la charge négative de la surface cellulaire.

Les cellules de LAB1, LAB2 et LAB3 ont été récupérées en phase stationnaire d'une culture en anaérobiose dans du milieu MRS_b pour réaliser la méthode MATS. Boonaert et Rouxhet, en 2000, ont mesuré les propriétés de surface (hydrophobicité et charge de surface) de cellules récupérées en phase exponentielle et en phase stationnaire. Sur une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et une souche de *Lactobacillus helveticus*, aucune différence n'a été montrée entre les propriétés des cellules récupérées à ces deux phases de croissance. Cette vérification n'a pas été réalisée dans notre cas. Nos résultats permettent néanmoins d'avoir une idée sur les propriétés de surface des souches de LAB utilisées pour l'incorporation dans les matrices polymériques. De plus, les cellules incorporées dans les matrices sont récupérées en fin de phase exponentielle. Les cellules dans les matrices sont à des stades différents de développement.

Les potentiels Zêta des trois souches de LAB en fonction du pH sont présentés **Figure 4.12**. Pour les valeurs de pH comprises entre 4 et 7 (gamme de pH des matrices polymériques incorporant des cellules de LAB), le potentiel Zêta varie pour les trois souches entre -20 et -30 mV. Sur cette gamme de pH, l'alginate de sodium et les caséinates de sodium sont également chargés négativement (paragraphe 4.1.3) et cela devrait induire d'importantes forces de répulsion électrostatiques. Néanmoins, les deux sources de biopolymères sont riches en sel (sodium) et les contre-ions cationiques en solution pourraient réduire les interactions répulsives par un effet d'écrantage favorisant ainsi d'autres interactions non spécifiques comme les liaisons hydrogènes ou les interactions hydrophobes.

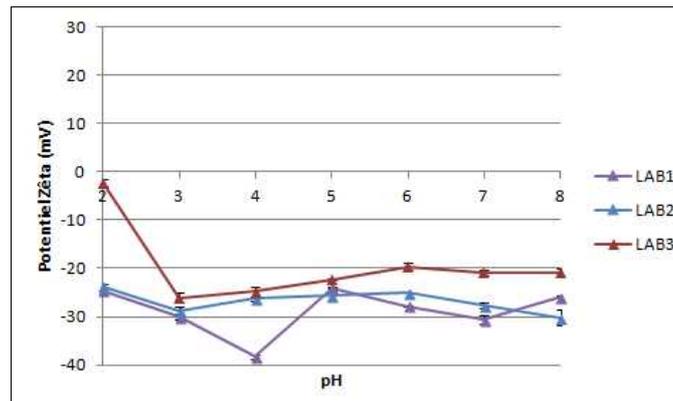


Figure 4.12 Potentiel Zêta d'une suspension de cellules de LAB1, LAB2, LAB3 (8.10^6 UFC.mL⁻¹) en fonction du pH dans un tampon imidazole/acétate à 5 mmol.L⁻¹ (n=3).

Ces données vont permettre de discuter de la localisation des cellules dans les matrices polymériques. Selon la méthode de MATS, *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2, et la souche de *Lactococcus lactis* LAB3 sont des souches hydrophiles avec une surface basique donneuse d'électrons. Malgré le faible caractère hydrophobe des surfaces de cellules de LAB, la contribution de telles interactions non spécifiques dans la répartition des cellules dans les systèmes polymériques biphasiques ne peut pas être exclue. Tandis que l'alginate est une macromolécule très hydrophile, les caséinates, comme d'autres protéines, possèdent des groupements hydrophobes le long de la chaîne peptidique dépliée capables de favoriser l'association avec les sites apolaires de la surface des cellules de bactéries lactiques (phospholipides, protéines intrinsèques).

4.3.1.3.2 Localisation des cellules de LAB dans les systèmes polymériques liquides

La localisation des cellules de LAB dans les mélanges polymériques alginate de sodium/caséinate de sodium a été mise en évidence par observations microscopiques en utilisant la microscopie confocale. Les cellules ont été incorporées dans un mélange de composition 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % (m/m) de MRS_b liquide à une concentration de 10^8 UFC.mL⁻¹. Les images présentées sur la **Figure 4.13** ont été réalisées juste après l'incorporation des cellules dans le mélange. Les cellules ont été marquées à l'aide du kit BacLight Live/Dead® (Syto 9, Iodure de Propidium) et les caséinates de sodium par la Rhodamine B Isothiocyanate (RITC).

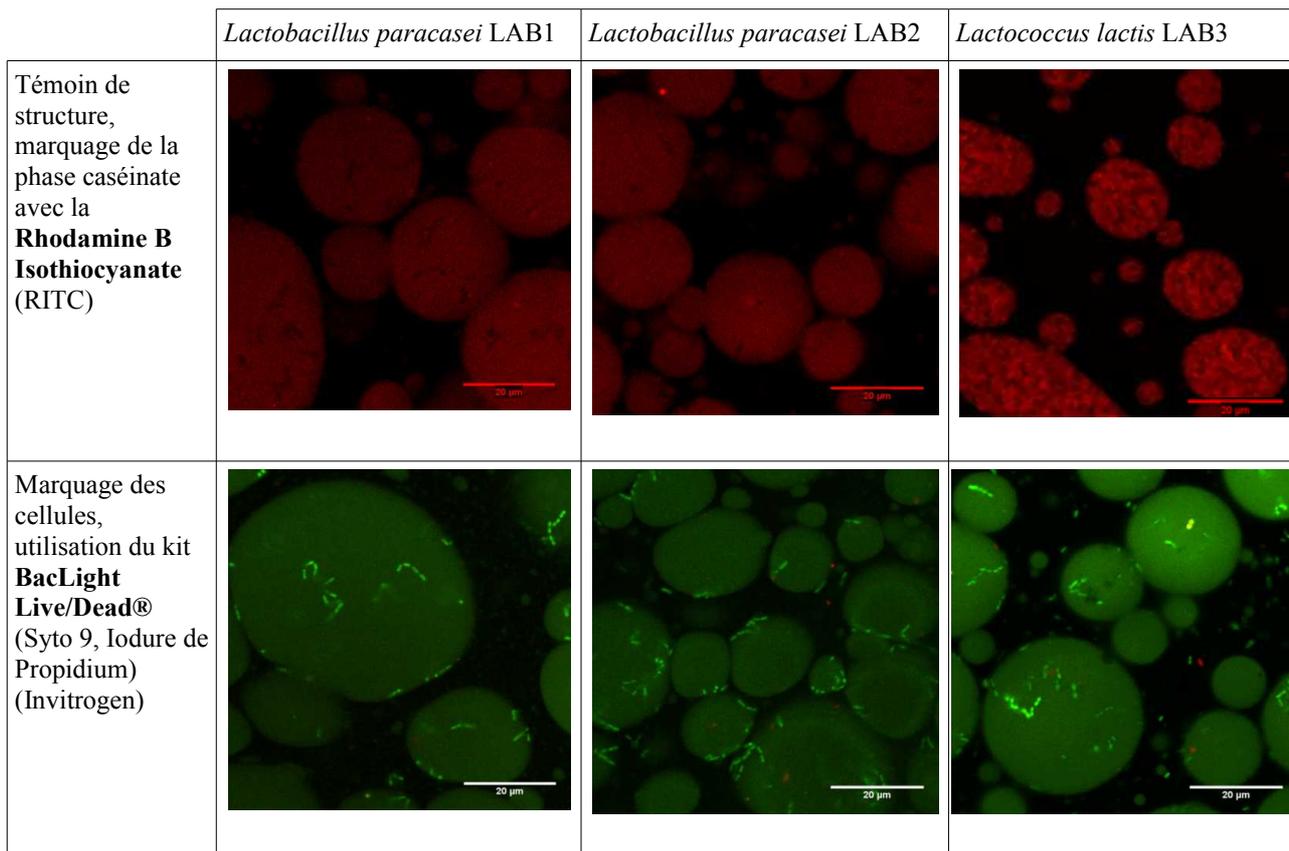


Figure 4.13 Localisation des cellules de LAB1, LAB2, LAB3 dans les matrices liquides alginate de sodium / caséinate de sodium / MRS (1,5/4/20 % (m/m)).

Observations en microscopie confocale (Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, Allemagne)).

Ces observations microscopiques permettent de localiser les cellules bactériennes des trois souches de LAB dans la phase protéique et/ou aux interfaces (spots verts et rouges dans les zones sphériques riches en protéines). Très peu de travaux concernent la distribution de cellules bactériennes dans des systèmes aqueux biphasiques (Millqvist-Fureby *et al.*, 2000 ; Leja *et al.*, 2009 ; Schwarz-Linek *et al.*, 2010). Comme cela a été mis en avant par Umakoshi *et al.* (1997), la répartition des cellules bactériennes dans un système biphasique aqueux (Dextran/PolyÉthylène Glycol) est influencée par différents effets qui agissent de façon indépendante : effets des sels, des ligands, interactions hydrophobes et électrostatiques. Dans notre étude, l'hypothèse serait celle d'une contribution dominante des interactions hydrophobes considérant que les contributions liées à la présence des sels et aux interactions électrostatiques sont relativement similaires entre les deux phases. Des localisations préférentielles de cellules bactériennes ont été observées pour d'autres systèmes biphasiques aqueux : poly(vinyl pyrrolidone) (PVP)/dextran (Millqvist-Fureby *et al.*, 2000), polystyrène sulfonate de sodium ou succinoglycane (2 polyélectrolytes anioniques) avec du tampon phosphate et des cellules bactériennes (Schwarz-Linek *et al.*, 2010). Schwarz-Linek *et al.*, en 2010,

ont également mis en avant un phénomène de déplétion pour expliquer la répartition préférentielle des cellules bactériennes dans leurs systèmes en faveur de la phase contenant le polyélectrolyte anionique. Ce mécanisme théorise le fait qu'une suspension de particules sphériques peut flocculer quand un polymère est ajouté au milieu. Si le volume disponible entre deux particules est moins important que le volume occupé par le polymère, l'espace entre deux particules ne sera plus accessible au polymère impliquant la flocculation des particules et l'augmentation des interactions entre molécules du polymère (Tolstoguzov, 2003). Concernant cette étude, si les cellules de LAB sont considérées comme des particules sphériques, les chaînes d'alginate pourraient favoriser la déplétion des cellules plus intensément que les molécules de caséinate expliquant ainsi l'exclusion des cellules de la phase continue riche en alginate au profit de la phase riche en protéine.

Cette localisation préférentielle dans la phase protéique et/ou aux interfaces est valable pour les trois souches étudiées dans les systèmes liquides. La concentration cellulaire est donc localement plus importante que la concentration cellulaire globale du système. Or la production d'actifs antimicrobiens par les LAB est souvent sous le contrôle d'un système de « Quorum Sensing » (QS) (Kuipers *et al.*, 1998). À des densités cellulaires faibles, les bactéries se comportent comme des microorganismes simples. Elles communiquent par le biais de petites molécules chimiques d'induction qui sont synthétisées et sécrétées dans le milieu. Elles peuvent donc percevoir la population totale environnante. Lorsque la concentration de la molécule signal atteint un seuil critique, l'expression des gènes et, par conséquent, le comportement de la population totale sont modifiés (Boyen *et al.*, 2009). Notre système biphasique alginate/caséinate permettant de confiner les cellules de LAB dans la phase protéique pourrait donc déclencher chez les cellules un mécanisme de QS et augmenter de ce fait l'activité bioprotectrice.

Dans le chapitre 5, l'évolution microscopique des systèmes liquides dans le temps ainsi que, leurs activités antimicrobiennes et la cultivabilité des cellules de LAB incorporées seront présentés. De plus, dans la perspective d'une application à la protection de surface, les systèmes ont été gélifiés. De la même façon, la microstructure du réseau gélifié et la localisation des cellules dans ce réseau ont été étudiées en utilisant la microscopie confocale et la microscopie électronique à balayage (MEB).

4.3.2 Systèmes gélifiés sous forme de billes

Le système biphasiques aqueux alginate de sodium/caséinate de sodium a été gélifié en

utilisant les propriétés gélifiantes de l'alginate, phase continue pour le mélange de composition 1,5 % (m/m) d'alginate / 4 % (m/m) de caséinate. Dans la littérature, deux méthodes de gélification sont citées :

- (i) Méthode « externe » ou dialyse : diffusion passive d'ions bivalents gélifiant (notre cas) ;
- (ii) Méthode « interne » : libération *in situ* d'ions bivalents gélifiant Ca^{2+} (introduits sous forme de sel peu soluble) par gradient de pH obtenu par acidification progressive en utilisant la glucono- δ -lactone (GDL) par exemple.

4.3.2.1 Réseau d'alginate et gel mixte

La planche d'images de la **Figure 4.14** présente les microstructures observées en microscopie confocale et en microscopie électronique à balayage des billes d'alginate et d'alginate/caséinate. Les échantillons observés ont été préparés à partir de billes venant d'être gélifiées. Sur ces échantillons, il n'y a donc pas eu de suivi cinétique.

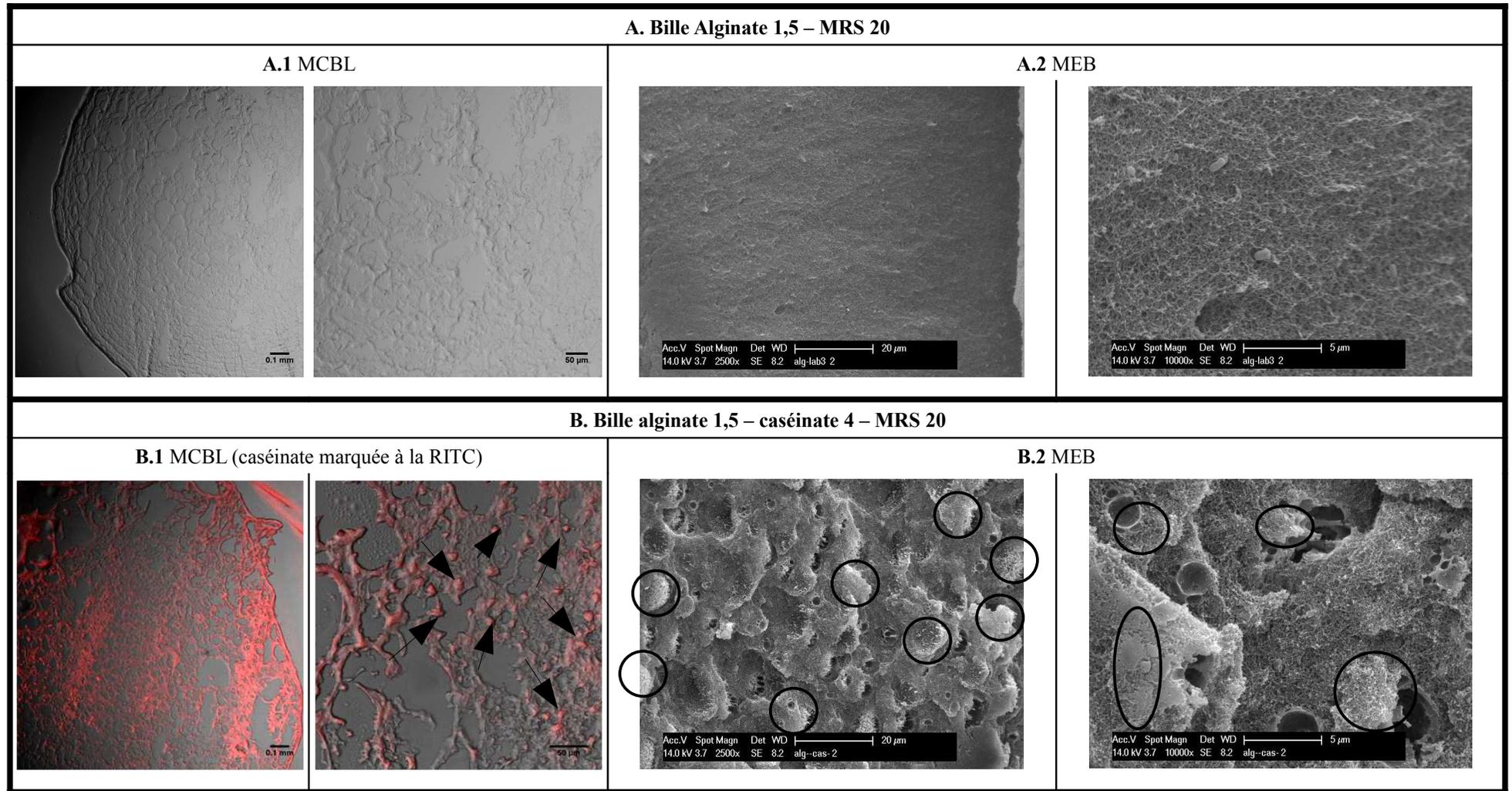


Figure 4.14 Observations microscopiques des billes d'alginate et d'alginate/caséinate (composition donnée en % (m/m)).

MCBL, coupe de 10 μm après fixation au paraformaldéhyde et congélation dans l'isopentane : A.1, B.1.

MEB, bille déshydratée par la méthode du point critique : A.2, B.2.

○ et → : microdomaines de protéine.

Le modèle de gélification de l'alginate communément retenu est le modèle dit de « boîtes à œufs » (Lee *et al.*, 2011). Cette organisation particulière des chaînes polyosidiques donne ce réseau typique visible sur nos images. Les ions Ca^{2+} permettent la jonction entre les zones GG des chaînes polyosides d'alginate. Un réseau tridimensionnel se forme par agrégation de plusieurs chaînes d'alginate.

D'après les images A. de la **Figure 4.14**, le réseau d'alginate est poreux et sa densité varie en fonction de la zone dans la bille. Auparavant, d'autres auteurs ont observé ce même type de structure. La méthode dite externe ou dialyse donnerait des systèmes plus hétérogènes que la méthode interne (Stoppel *et al.*, 2011). Généralement, le gel est plus dense (réseau serré) sur le bord de la bille et plus ouvert et poreux au centre de la bille (Thu *et al.*, 2000 ; Wright *et al.*, 2009). Cet effet a également été retrouvé sur nos clichés. Une membrane épaisse et solide a été mise en évidence, l'intérieur des billes quant à lui présente de nombreux pores (**Figure 4.14** images A.1). Cette hétérogénéité peut être expliquée par un mécanisme de gélification rapide et quasi-irréversible, caractérisé par un site de liaison à forte réticulation des ions, et une vitesse de diffusion relative entre les ions calcium et les molécules de polymère insuffisante par rapport à la vitesse du mécanisme de gélification (Thu *et al.*, 1996). Néanmoins, l'augmentation de la concentration en ions calcium permet d'obtenir des billes moins hétérogènes. Thu *et al.*, en 2000, ont réalisé des images en résonance magnétique (IRM) de billes d'alginate (de 2,3 mm de diamètre à 1,8 % (m/v) d'alginate riche en unités G) gélifiées avec 50 et 100 mmol.L⁻¹ de CaCl_2 pour étudier la répartition de la concentration en polymère. Les billes gélifiées avec une concentration en CaCl_2 de 100 mmol.L⁻¹ (concentration utilisée dans notre étude) ont montré une meilleure homogénéité.

L'hétérogénéité de ce gel peut également être expliquée par la teneur en unités G et la longueur des blocs GG déterminée précédemment par l'analyse RMN¹H. L'alginate utilisé est principalement composé d'unités M (75 %), de structure en blocs avec des blocs d'unités G composés d'environ 7 monomères. Selon Gombotz et Wee, en 2012, pour obtenir des billes avec des propriétés mécaniques fortes, une meilleure stabilité vis-à-vis des cations, l'alginate doit être composé de plus de 70 % d'unités G et la longueur moyenne de ses blocs GG doit être de plus de 15 unités. Un gel réalisé à partir d'un alginate pauvre en G sera plus déformable et moins rigide. Même si d'un point de vue structurel, ce gel fragile obtenu peut être un inconvénient, pour la diffusion (1) des métabolites de la bille vers les cellules, (2) des actifs antimicrobiens des cellules productrices vers l'extérieur de la bille, la structure de ce réseau poreux pourrait s'avérer être un avantage.

Concernant les billes d'alginate/caséinate, le réseau d'alginate et celui de caséinate semblent enchevêtrés sur les observations en microscopie confocale et sont difficilement identifiables par le marquage fluorescent des caséinates (**Figure 4.14** images B.1). Néanmoins, à des forts

grossissements, des zones de formes sphériques fluorescent plus intensément (zones pointées par des flèches **Figure 4.14** image B.1). Dans un premier temps, deux hypothèses peuvent être proposées : (i) soit ces zones seraient plus concentrées en protéine, (ii) soit cette fluorescence serait due au relief de la coupe. Les observations en MEB ont permis de valider la première hypothèse (i). En effet, sur les images B.2 (**Figure 4.14**), des zones plus claires riches en protéines (comme des inclusions) dans le réseau d'alginate typique peuvent être distinguées (zones cerclées sur les images B.2 **Figure 4.14**). La gélification aurait donc permis de fixer l'état de séparation de phase instantanément. Aucun travail n'a été publié sur l'étude de microstructure de billes gélifiées réalisées à partir d'un mélange polymérique aqueux biphasique permettant la comparaison avec nos résultats.

Les cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 ont été incorporées dans les mélanges polymériques avant la gélification. De la même façon que précédemment, la localisation de ces cellules a été étudiée en fixant les billes dès l'état initial. Sur ces échantillons, il n'y a donc pas eu de suivi cinétique.

4.3.2.2 Localisation des cellules dans les systèmes polymériques gélifiés (sous forme de billes)

Deux séries d'expérimentation ont été menées avec une charge bactérienne initiale différente : C1, 10^{5-6} UFC/bille et C3, 10^{7-8} UFC/bille. La charge C3 a été utilisée pour visualiser les cellules de façon optimale. Pour les observations en microscopie confocale, les cellules de bactéries lactiques et la phase protéique ont été marquées, respectivement, en utilisant le fluorochrome Syto[®]9 et la RITC. Les images des billes d'alginate et d'alginate/caséinate avec les cellules de LAB3 sont présentées sur les **Figures 4.15** et **4.16**.

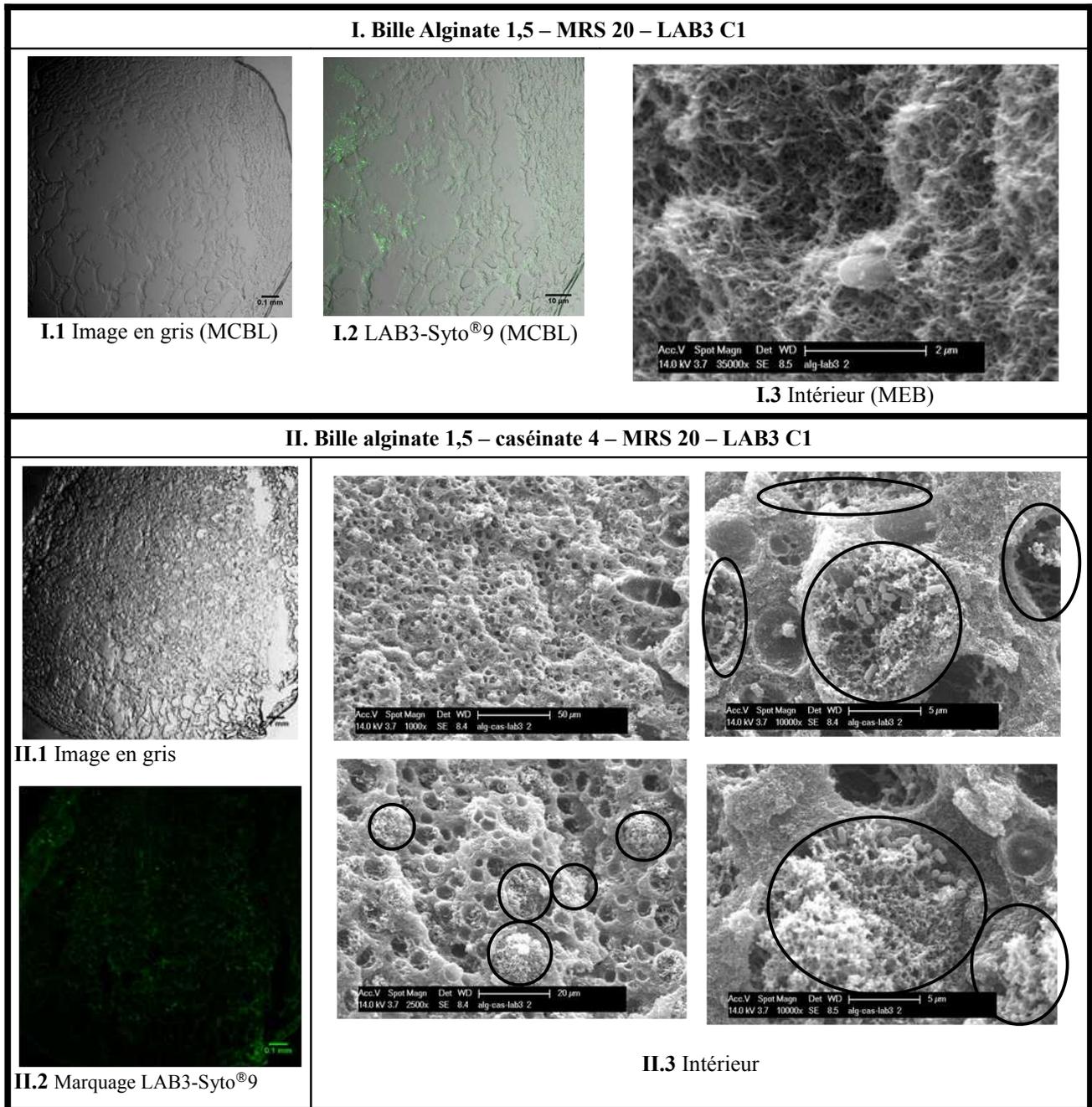


Figure 4.15 Observations microscopiques des billes d'alginate et d'alginate/caséinate (composition donnée en % (m/m)) en présence de cellules de LAB3 incorporées à C1 (10^{5-6} UFC/bille).

MCBL, coupe de 10 µm après fixation au paraformaldéhyde et congélation dans l'isopentane : I.1, I.2, II.1, II.2.
MEB, bille déshydratée par la méthode du point critique : I.3, II.3.

○ microdomaines de protéine.

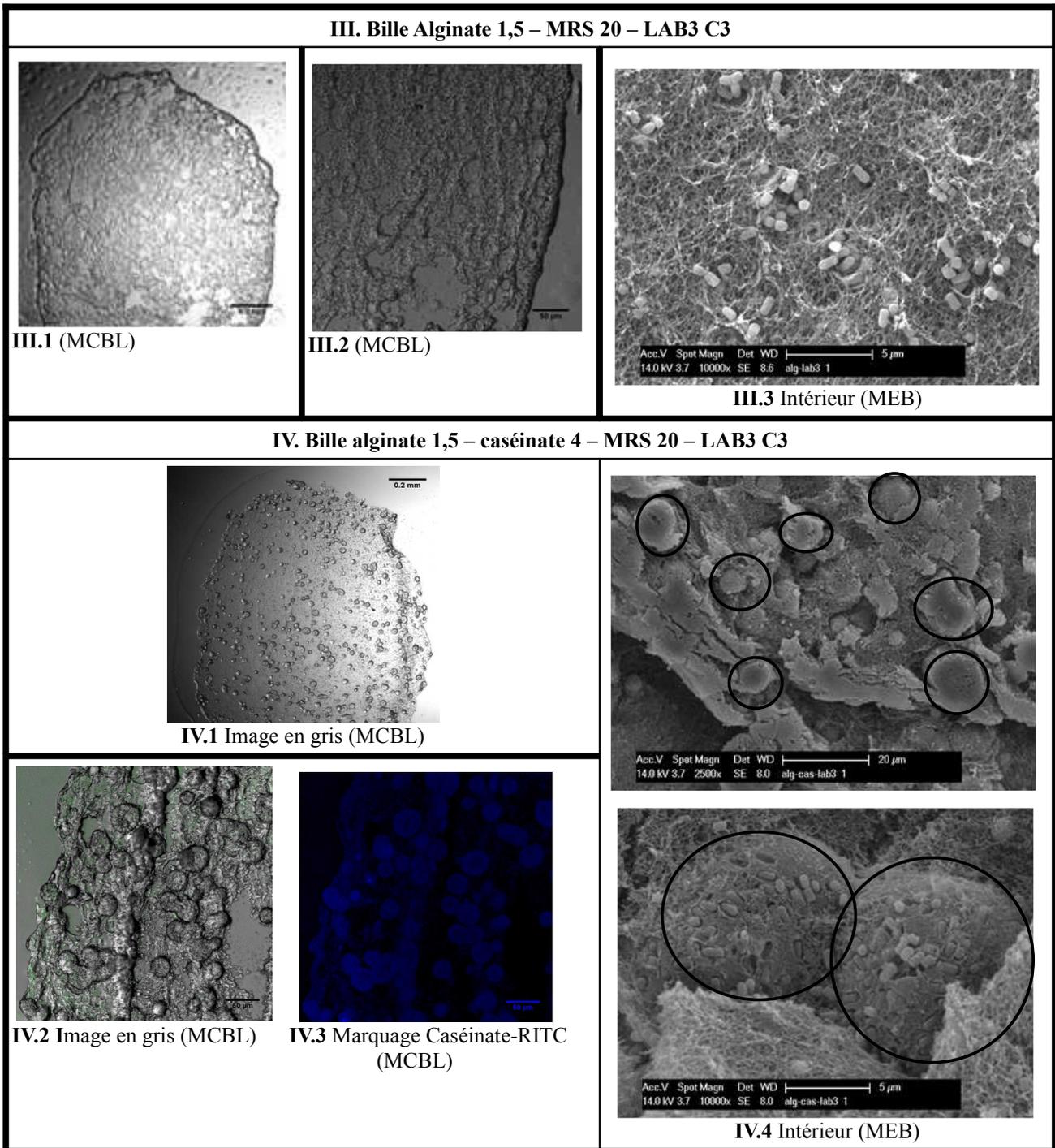


Figure 4.16 Observations microscopiques des billes d'alginate et d'alginate/caséinate (composition donnée en % (m/m)) en présence de cellule de LAB3 incorporées à C3 (10^{7-8} UFC/bille).

MCBL, coupe de 10 µm après fixation au paraformaldéhyde et congélation dans l'isopentane : III.1, III.2, IV.1, IV.2, IV.3.

MEB, bille déshydratée par la méthode du point critique : III.3, IV.4.

○ microdomaines de protéine.

Les cellules de bactéries lactiques sont connues pour former des chaînes ou des diplocoques. D'après les observations en MEB, les cellules de la souche LAB3 forment des diplocoques observables par exemple sur l'image III.3 de la **Figure 4.16**. Sur les images des coupes en microscopie confocale (images I.2 et II.2 **Figure 4.15**), il semblerait que les cellules de LAB3 soient plutôt regroupées vers le cœur de la bille où le gel est moins dense. Cette localisation pourrait s'expliquer par le fait qu'elles aient été amenées vers le centre au fur et à mesure de la progression du front de gélification.

Dans les billes d'alginate seul, les cellules semblent piégées dans le réseau alginique tridimensionnel. Cette immobilisation serait de type mécanique, le réseau en se formant entoure les cellules (image I.3 **Figure 4.15**). La formation des billes avec la concentration initiale C3 permet d'établir le fait que les cellules sont dispersées dans l'ensemble du réseau (image III.3 **Figure 4.16**). Dans le réseau alginate/caséinate, la localisation des cellules est différente. Des microdomaines de protéine ont pu être identifiés en clair sur les images en MEB (images II.3 **Figure 4.15**) et marqués par la RITC en microscopie confocale (image IV.3 **Figure 4.16**). A l'intérieur de ces zones riches en protéines, les cellules bactériennes ont été mises en évidence. Cela confirme leur affinité pour cette phase, précédemment observée dans les systèmes liquides.

Les microstructures obtenues avec les charges C1 (images II. **Figure 4.15**) et C3 (images IV. **Figure 4.16**) pour le réseau alginate/caséinate montrent quelques différences. Dans le premier cas, les microdomaines de protéines semblent moins denses que dans le deuxième cas. Le pH est un paramètre déterminant dans la stabilité de tels systèmes aqueux biphasiques, mais celui-ci a été mesuré avant gélification dans les deux cas à 5,4. La différence entre ces deux séries d'expérimentation est la charge initiale de cellules, celle-ci aurait pu également jouer un rôle en modifiant l'équilibre structurel du mélange avant gélification.

Les images en MEB peuvent également expliquer la difficulté rencontrée pour l'observation des cellules en microscopie confocale sur les coupes. Les cellules ont une longueur de 1 à 2 μm et les coupes une épaisseur de 10 μm . Alors que les cellules doivent se trouver dans cette épaisseur, il a été difficile de les observer en microscopie confocale notamment pour la charge C1. Les images en MEB ont montré que les cellules de LAB3 étaient comme enfouies dans les microdomaines protéiques, d'où la difficulté de mieux les observer sur les coupes. Les limites de la microscopie confocale semblent avoir été atteintes pour l'observation d'objets de 1 à 2 μm dans ce système complexe et pour le protocole mis en place.

Peu de chercheurs se sont intéressés à l'étude de systèmes biphasiques aqueux gélifiés sous forme de billes incorporant des cellules de bactéries lactiques. Millette *et al.*, 2004, ont immobilisé des

cellules de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 bioprotectrices dans des billes d'alginate/lactosérum mais ils n'ont pas étudié les microstructures de tels systèmes.

Par rapport à un système gélifié avec uniquement de l'alginate, le mélange biphasique alginate/caséinate permet d'obtenir une structure faite d'un réseau d'alginate gélifié tridimensionnel classique et de microdomaines protéiques. Les cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 se localisent dans ces microdomaines protéiques qui leur apportent alors une double protection (couche de caséinate puis couche d'alginate) et une source potentielle de nutriment puisqu'un grand nombre de souches de *Lactococcus lactis* spp. est doté d'une activité protéolytique leur permettant de métaboliser des protéines (Salminen et Von Wright, 2009).

4.4 Conclusion

D'après la réalisation des diagrammes de phases à trois pH différents (7,0 ; 6,0 et 5,5) pour le mélange alginate de sodium/caséinate de sodium et l'étude des microstructures, une formulation a été retenue pour le confinement des cellules de bactéries lactiques bioprotectrices : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium. Cette formulation permet d'avoir un système dans la zone d'incompatibilité du mélange présentant une microstructure s'apparentant à une émulsion avec une phase continue d'alginate et une phase dispersée de caséinate de sodium.

Des premiers résultats concernant le potentiel bioprotecteur de tels systèmes non gélifiés et gélifiés immobilisant des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 ont été présentés. Ils ont révélé la nécessité d'apporter une source de nutriments aux cellules de bactéries lactiques confinées. En effet, la production d'actifs antimicrobiens semble liée à la concentration cellulaire. Pour les formulations avec alginate seul ou alginate/caséinate, gélifiées ou non gélifiées, les cellules de LAB3 ont montré une meilleure cultivabilité en présence de MRS_b de plus de 1 log par mL ou par bille, suivant les cas, à 8 jours avec un stockage à 30°C. Par conséquent, les meilleures activités antimicrobiennes ont été mises en évidence pour les mélanges contenant du MRS_b. Le milieu MRS_b a été ajouté au mélange polymérique à 20 % (m/m). L'influence de cet ajout sur l'équilibre du mélange alginate de sodium/caséinate de sodium a été observée d'un point de vue macroscopique et microscopique. Dans les deux cas, le milieu MRS_b ne semble pas perturber ni la cinétique de déphasage, ni la microstructure du système.

Les cellules de LAB1, LAB2 et LAB3 ont été incorporées dans le mélange 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % MRS_b et pour ces trois souches de deux genres différents (*Lacobacillus* et *Lactococcus*), une localisation préférentielle a été observée

dans la phase protéique que ce soit dans les systèmes liquides ou gélifiés. A partir des informations recueillies par la caractérisation de leurs propriétés de surface par la méthode MATS et la mesure du potentiel Zêta en fonction du pH (surface hydrophile, donneuse d'électrons (base au sens de Lewis), chargée négativement), plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant à la localisation préférentielle des cellules. Celle-ci pourrait être due à des interactions hydrophobes. Même si le faible caractère hydrophobe des surfaces de cellules de LAB a été démontré, la contribution de telles interactions non spécifiques dans la répartition des cellules dans les systèmes polymériques biphasiques étudiés ne peut pas être exclue. L'alginate est une macromolécule très hydrophile, mais les caséinates, comme d'autres protéines, possèdent des groupements hydrophobes le long de la chaîne peptidique dépliée capables de favoriser l'association avec les sites apolaires de la surface des cellules de bactéries lactiques (phospholipides, protéines intrinsèques). Une seconde hypothèse est liée au phénomène de déplétion. Si les cellules de LAB sont considérées comme des particules sphériques, les chaînes d'alginate pourraient favoriser la déplétion des cellules plus intensément que les molécules de caséinate expliquant ainsi l'exclusion des cellules de la phase continue riche en alginate. Ces hypothèses sont difficiles à discuter du fait du manque de littérature sur des systèmes similaires au nôtre.

La localisation des cellules de LAB dans ces systèmes polymériques pourrait jouer un rôle majeur vis-à-vis de la survie et de l'activité antimicrobienne. En effet, cette colocalisation préférentielle apporte une double protection et les caséinates peuvent aussi être vus comme une source potentielle de nutriment. De plus, la concentration en cellules est localement plus importante que la concentration globale du système. Comme la production d'actifs antimicrobiens et la régulation de la population se font généralement pour les bactéries lactiques par le mécanisme de « Quorum Sensing » dont la réponse est liée à la densité cellulaire, cet aspect de confinement est à mettre en avant pour obtenir une activité bioprotectrice significative.

Au terme du chapitre 3, trois souches de LAB bioprotectrices ont été sélectionnées : 2 souches de *Lactobacillus paracasei* (LAB1 et LAB2) et une souche de *Lactococcus lactis* (LAB3). Ces trois souches ont montré une activité antimicrobienne anti-*Listeria* spp. due en partie à des actifs de nature peptidique. À partir des données présentées dans ce chapitre 4 sur le système polymérique de confinement et au chapitre 3 sur les souches de LAB bioprotectrices, le dernier chapitre va être consacré à l'étude du potentiel antimicrobien des matrices composées à 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % (m/m) MRS₆ immobilisant des cellules de LAB bioprotectrices.

CHAPITRE 5 : Évaluation de l'activité antimicrobienne des matrices polymériques, supports des actifs antimicrobiens produits *ex situ* et *in situ*

Ce dernier chapitre porte sur l'activité antimicrobienne des matrices d'alginate et d'alginate/caséinate, supports des surnageants de culture ou des cellules des souches de LAB sélectionnées. Le potentiel antimicrobien a été testé suivant la méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis de trois souches de Listeria spp. : L. innocua LRGIA01, L. innocua ATCC 33090 et L. monocytogenes S162. Les matrices contenant les cellules ont été conservées pendant 12 jours à 30°C ou 4°C.

Dans un premier temps, les matrices liquides incluant les cellules de LAB3, LAB1 ou LAB2 ont été suivies concernant la viabilité des cellules, l'activité anti-Listeria et la microstructure (observations au MCBL). Plusieurs facteurs peuvent entrer en jeu pour obtenir une activité antimicrobienne significative : la densité de la population dans la matrice, la libération des actifs antimicrobiens des matrices vers le milieu gélosé et la diffusion de ces actifs dans le milieu gélosé. Pour répondre aux questions concernant la libération des molécules actives des matrices polymériques, du surnageant de culture a été introduit dans les matrices.

Le travail réalisé avec les matrices liquides a été reproduit avec les matrices gélifiées sous forme de billes. Pour la souche de Lactococcus lactis (LAB3), des essais ont également été réalisés en incorporant les cellules dans des gels plans.

5.1 Activité antimicrobienne des matrices polymériques liquides, supports des actifs antimicrobiens produits ex situ et in situ

5.1.1 Évaluation de l'effet des cultures des souches de LAB sélectionnées dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate liquides sur le développement de *Listeria* spp., production des actifs antimicrobiens in situ

Pour les trois souches sélectionnées LAB1, LAB2, LAB3, les cellules ont été incorporées dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate, dans un premier temps liquides, en suivant lors d'un stockage de 12 jours à 30°C, l'activité anti-*Listeria* et la survie des cellules de LAB.

5.1.1.1 Suivi de la cultivabilité et de l'activité anti-Listeria

5.1.1.1.1 Souche bioprotectrice : *Lactococcus lactis* LAB3

Les cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 ont été incorporées dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate contenant du milieu MRS_b à deux charges initiales : C1, 10⁸ UFC.mL⁻¹ et C2, 10⁴ UFC.mL⁻¹. La cultivabilité des cellules de LAB3 a été mesurée dans chacune des matrices (**Figure 5.1**), par un dénombrement classique sur boîte de Pétri, pour comparer l'aptitude des matrices d'alginate et d'alginate/caséinate pour la croissance et la survie des cellules de LAB3.

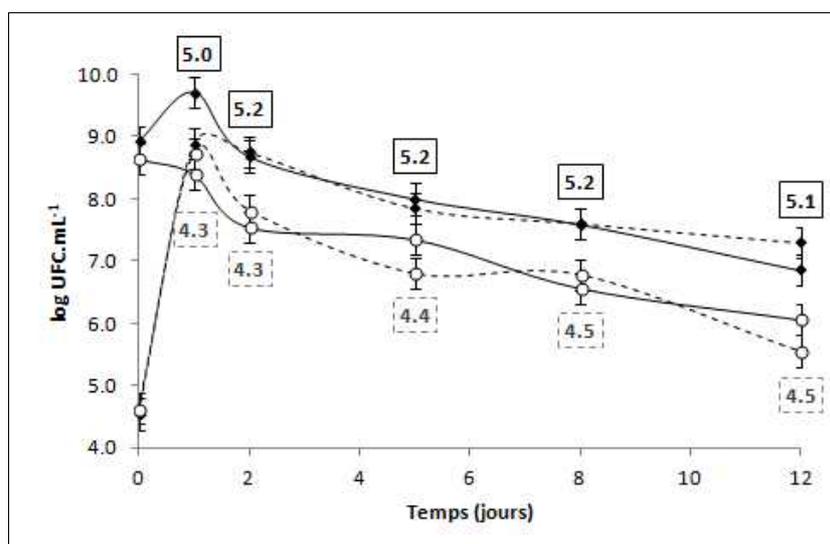


Figure 5.1 Cultivabilité des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 incorporées dans les matrices polymériques liquides stockées à 30°C pendant 12 jours.

(○), alginate de sodium à 1,5 % (m/m) + 20 % (m/m) de MRS_b

(◆), alginate de sodium à 1,5 % (m/m) + caséinate de sodium à 4 % (m/m) + 20 % (m/m) de MRS_b

C1 (—), charge initiale en cellules de LAB3 de 10⁸ UFC.mL⁻¹ ; C2 (- - -), charge initiale en cellules de LAB3 de 10⁴ UFC.mL⁻¹.

Les valeurs de pH sont inscrites en noir au-dessus des points pour les matrices alg/cas et en gris en-dessous des points pour les matrices alg.

Pour les deux charges initiales et quelle que soit la composition de la matrice (alg ou alg/cas), la densité cellulaire maximale atteinte est d'environ 10⁹ UFC.mL⁻¹ après 24h. Ensuite, la population diminue au cours des 11 autres jours jusqu'à 10⁷ et 10⁶ UFC.mL⁻¹, respectivement, dans les matrices alg/cas et alg. Les cellules de LAB3 survivent donc mieux dans les matrices alg/cas. Sanchez-Gonzalez *et al.*, en 2013, ont observé une meilleure survie de cellules de LAB, pendant 30 jours à 4°C et à 75 % d'humidité relative, dans des films de caséinate de sodium et de protéine de pois par rapport à des films de méthylcellulose et d'hydroxypropylmethylcellulose. De la même manière, Gialamas *et al.*, en 2010, ont montré une diminution de moins de 1 log UFC.cm⁻² d'une population de *Lactobacillus sakei* incorporée dans des films de caséinate de sodium stockés pendant 30 jours à 25 et 4°C. Concha-Meyer *et al.*, 2011, ont également immobilisé deux souches de LAB (*Carnobacterium maltaromaticum*) dans des films d'alginate de sodium contenant de l'amidon et du glycérol à une charge initiale de 10^{7-7,5} UFC.cm⁻². A la suite d'un stockage à 4°C pendant 28 jours en contact d'une pièce de saumon, les deux souches de LAB ont présenté une phase stationnaire. Ils ont fait l'hypothèse que ce maintien de la viabilité pouvait être dû à la diffusion de nutriments du saumon vers le film.

L'effet positif sur la survie de l'ajout de caséinate de sodium à une matrice d'alginate (formant un système aqueux biphasique), montré dans notre cas, pourrait résulter d'un apport nutritionnel supplémentaire : par exemple, Bury *et al.*, 1998, ont observé que l'ajout d'une source de protéine (concentré de lactosérum) dans un milieu de culture stimulait la croissance des LAB.

Les travaux en microscopie présentés au chapitre 4 ont permis de localiser les cellules de LAB dans le système aqueux biphasique alg/cas préférentiellement dans la phase protéique. Il peut en résulter un effet de protection pendant le temps de stockage dû à cet apport nutritionnel mais aussi à un effet tampon des caséinates.

En effet, une seconde contribution positive des caséinates ajoutées à l'alginate est une diminution du pH moins importante que dans les matrices d'alginate uniquement. Cet effet est dû aux propriétés tampon des caséinates. La diminution du pH dans les matrices est engendrée par la production d'acides organiques (comme l'acide lactique) par les cellules de LAB3 : la capacité à tamponner le milieu des caséinates a permis de maintenir un pH aux alentours de 5,0 alors que dans les matrices d'alginate, le pH est d'environ 4,0 (**Figure 5.1**). Ce pH moins acide dans les systèmes alg/cas pourrait réduire le stress acide des cellules de LAB favorisant ainsi une meilleure survie.

La survie des cellules viables de LAB3 dans les systèmes alg et alg/cas pendant le stockage est une condition nécessaire mais non suffisante pour obtenir des systèmes bioprotecteurs : en effet, les cellules de LAB confinées doivent également exercer leur activité antimicrobienne vis-à-vis de *Listeria*. L'activité antimicrobienne peut être influencée directement par les cellules bactériennes (c'est le cas pour la compétition pour l'espace et les nutriments), par des molécules fixées aux cellules ou des molécules libérées dans l'environnement extracellulaire.

Par conséquent, l'activité antimicrobienne des cellules de LAB3 incorporées dans les matrices alg et alg/cas a été suivie pendant 12 jours à 30°C par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé contre *L. innocua* LRGIA01 et *L. monocytogenes* S162 (**Figure 5.2**). Les mélanges contenant la charge initiale en cellules de LAB3 la plus élevée (C1, 10^8 UFC.mL⁻¹) ont montré une activité antagoniste significative vis-à-vis des deux souches de *Listeria* immédiatement après incorporation des cellules contrairement aux mélanges où la charge initiale était de 10^4 UFC.mL⁻¹ (C2). Dans ce dernier cas, une zone d'inhibition n'apparaît qu'après 24h d'incubation lorsque la population bactérienne a atteint 10^9 UFC.mL⁻¹ (comme présenté **Figure 5.1**). La charge initiale en cellules de LAB apparaît donc comme un paramètre clé pour l'application bioprotectrice de tels systèmes : une charge initiale en cellules conséquente est nécessaire pour obtenir une activité

immédiate, alors que pour une activité différée de 24h, une charge initiale moins importante serait suffisante.

Le fait que, plus la population en cellules de LAB3 est élevée, plus l'activité anti-*Listeria* est importante, ceci est à relier au phénomène de « Quorum Sensing » (QS). En effet, pour plusieurs espèces bactériennes et notamment les bactéries lactiques, l'excrétion de molécules antimicrobiennes (en particulier de bactériocines) et l'immunité vis-à-vis de ces mêmes composés sont régulées par un système de QS (Czaran et Hoekstra, 2007). Celui-ci permet à la population bactérienne de libérer et de répondre à des molécules signales ou autoinducteurs (oligopeptides et autoinducteur 2 produit par LuxS chez les bactéries à Gram-positif (Kleerebezem *et al.*, 1997)). Les cellules sont capables de détecter la densité de la population bactérienne environnante (théorie des quotas) grâce à un système composé de récepteurs et de mécanisme de transduction provoquant la sécrétion de bactériocines et de facteurs d'immunité pour ces bactériocines produites. Un tel système pourrait expliquer la réponse antimicrobienne immédiate pour les systèmes avec la charge initiale la plus élevée (C1). Cela révélerait un système de régulation de la production d'actifs antimicrobiens dépendant de la densité cellulaire. Ce type de mécanisme a été identifié pour plusieurs souches de LAB et notamment des souches productrices de bactériocines. Ge *et al.*, en 2011, ont montré que l'activité antimicrobienne de la souche *Lactobacillus paracasei* HD1.7 dépendait de la densité cellulaire. Une activité antimicrobienne a été détectable dès lors que la densité cellulaire a atteint le seuil de 0,3311 g.L⁻¹ de cellules sèches dans le milieu (DO à 600 nm de 0,8). Cette souche est productrice d'une bactériocine, paracine 1.7, qui s'est avérée être également la molécule signal d'un système de type QS permettant une auto-induction de la production de cette bactériocine.

En effet, généralement, les peptides autoinducteurs d'un système de QS n'ont pas d'autre fonction que le rôle de signal. Les bactériocines, quant à elles, peuvent avoir plusieurs rôles : molécule signal, molécule antimicrobienne active, molécule colonisatrice (Dobson *et al.*, 2012). La nisine est l'exemple le plus connu : elle est à la fois la molécule signal et la molécule active. Sa synthèse est donc dépendante de la densité cellulaire (Kuipers *et al.*, 1995 ; Garcia-Parra *et al.*, 2011). D'autres cas peuvent être cités comme la subtiline (produite par une souche de *Bacillus subtilis*), la salivaricine Abp118 (produite par *Lactobacillus salivarius* ICC18), la plantaricine A (produite par *Lactobacillus plantarum* C11).

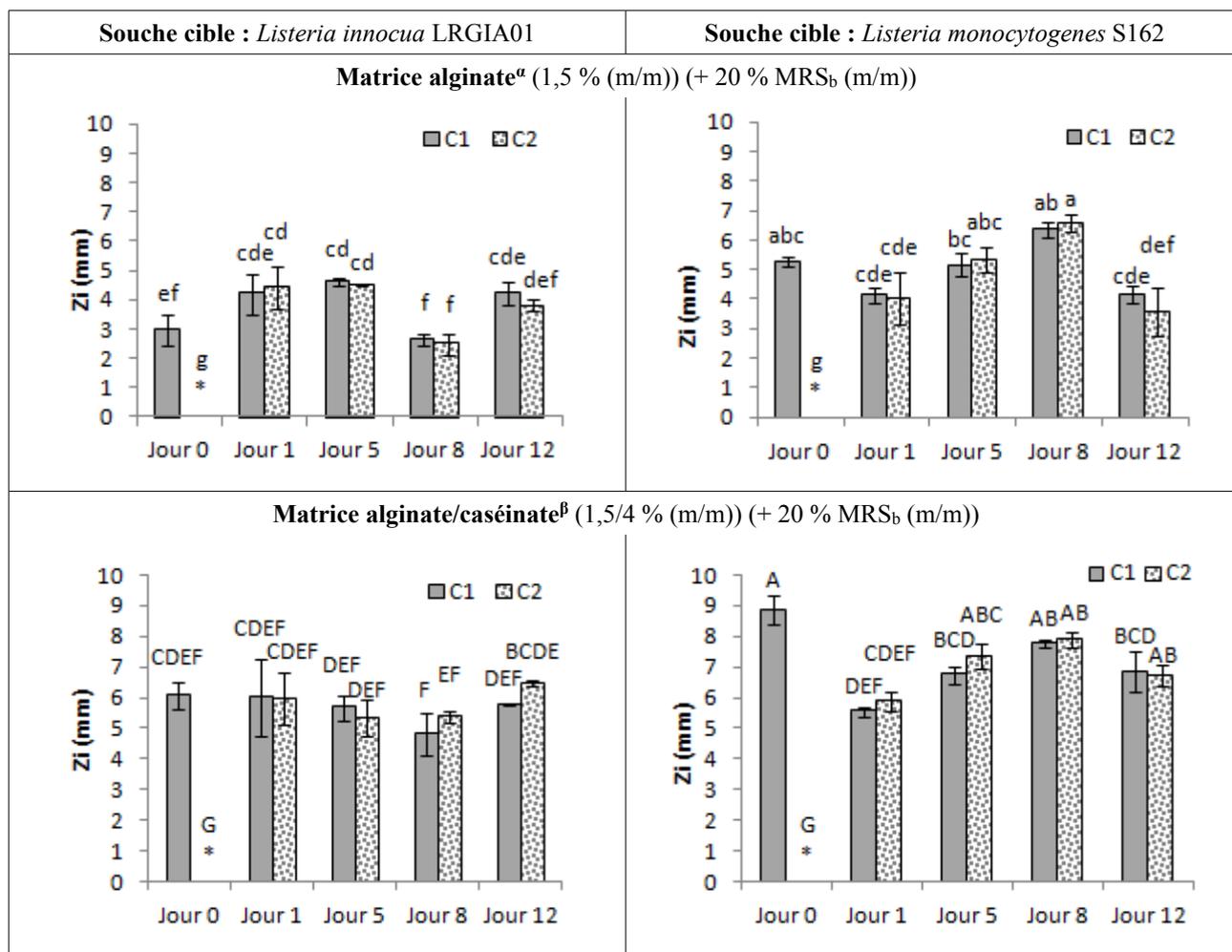


Figure 5.2 Zones d'inhibition (Z_i (mm)) formées par les matrices polymériques liquides incorporant des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria monocytogenes* S162 et *Listeria innocua* LRGIA01 mesurées par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h).

α , β : Les résultats obtenus dans les matrices alginate et alginate/caséinate forment deux groupes statistiquement différents d'après le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Pour une même composition de matrice, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

C1, charge initiale en cellules de LAB3 de 10^8 UFC.mL⁻¹ ; C2, charge initiale en cellules de LAB3 de 10^4 UFC.mL⁻¹.

* : aucune zone d'inhibition observée.

Après les premières 24 heures du stockage à 30°C, l'activité antimicrobienne, sur les deux souches de *Listeria* et pour les deux charges en LAB, est régulière sur les 11 autres jours (**Figure 5.2**). Cependant, il est difficile de déterminer si l'activité antimicrobienne mesurée est due à la production d'agents antimicrobiens régulière sur les 12 jours ou à leur production pendant les 24 premières heures suivie d'une lente diffusion.

Une autre tendance à signaler est l'activité antimicrobienne significativement plus

importante pour les matrices alg/cas comparée à celle des matrices alg ($p < 0,05$). Cela semblerait indiquer que l'activité antimicrobienne observée n'est pas principalement due à un effet pH, puisque, comme indiqué précédemment, l'acidification de la matrice est plus importante dans le cas des matrices d'alginate uniquement.

Cette activité anti-*Listeria* des matrices alg/cas plus importante pourrait être due à :

- (i), une population bactérienne plus élevée : environ 1 log UFC.mL⁻¹ de plus que dans les matrices d'alginate uniquement ;
- (ii), une meilleure libération des composés antimicrobiens de la matrice vers le milieu gélifié.

De plus, l'effet tampon des caséinates (**Figure 5.1**) (maintien du pH aux alentours de 5,0 par rapport à un pH de 4,0 dans les matrices d'alginate) pourrait également avoir un rôle dans la stabilité des métabolites antimicrobiens et par conséquent leur action. Par exemple, la lacticine 481 produite par *Lactococcus Lactis* CNRZ 481 est plus stable à pH = 7 qu'à pH = 4,5 (Piard *et al.*, 1990).

Pour diversifier l'approche, il était aussi intéressant de pouvoir avoir des résultats avec d'autres souches de LAB. A partir des souches sélectionnées, les mêmes expérimentations ont été menées sur les deux souches *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2.

5.1.1.1.2 Souches bioprotectrices : *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2

Les deux taux d'inoculation initiaux qui ont été testés pour ces deux souches sont les suivants :

- C1 : 10¹⁰ UFC.mL⁻¹ pour LAB1 et 10⁹ UFC.mL⁻¹ pour LAB2 ;
- C2 : 10⁵ UFC.mL⁻¹ pour les deux souches.

Les populations bactériennes de LAB1 et LAB2 ont été suivies pendant 12 jours avec un stockage à 30°C et les activités antimicrobiennes des matrices d'alg et d'alg/cas incorporant les cellules de LAB ont été mesurées contre deux souches de *L. innocua* : *innocua* LRGIA01 et *innocua* ATCC 33090 (**Figure 5.3** et **Figure 5.4**). Il est à noter que sur les **Figures 5.3, 5.4** puis **5.10, 5.11, 5.12** (présentées dans la partie gélification (5.2.2)), les analyses (dénombrements et activités antimicrobiennes) n'ont pas été réalisées à intervalle régulier, les tracés de cultivabilité sont donc des tendances, il faut se référer aux valeurs.

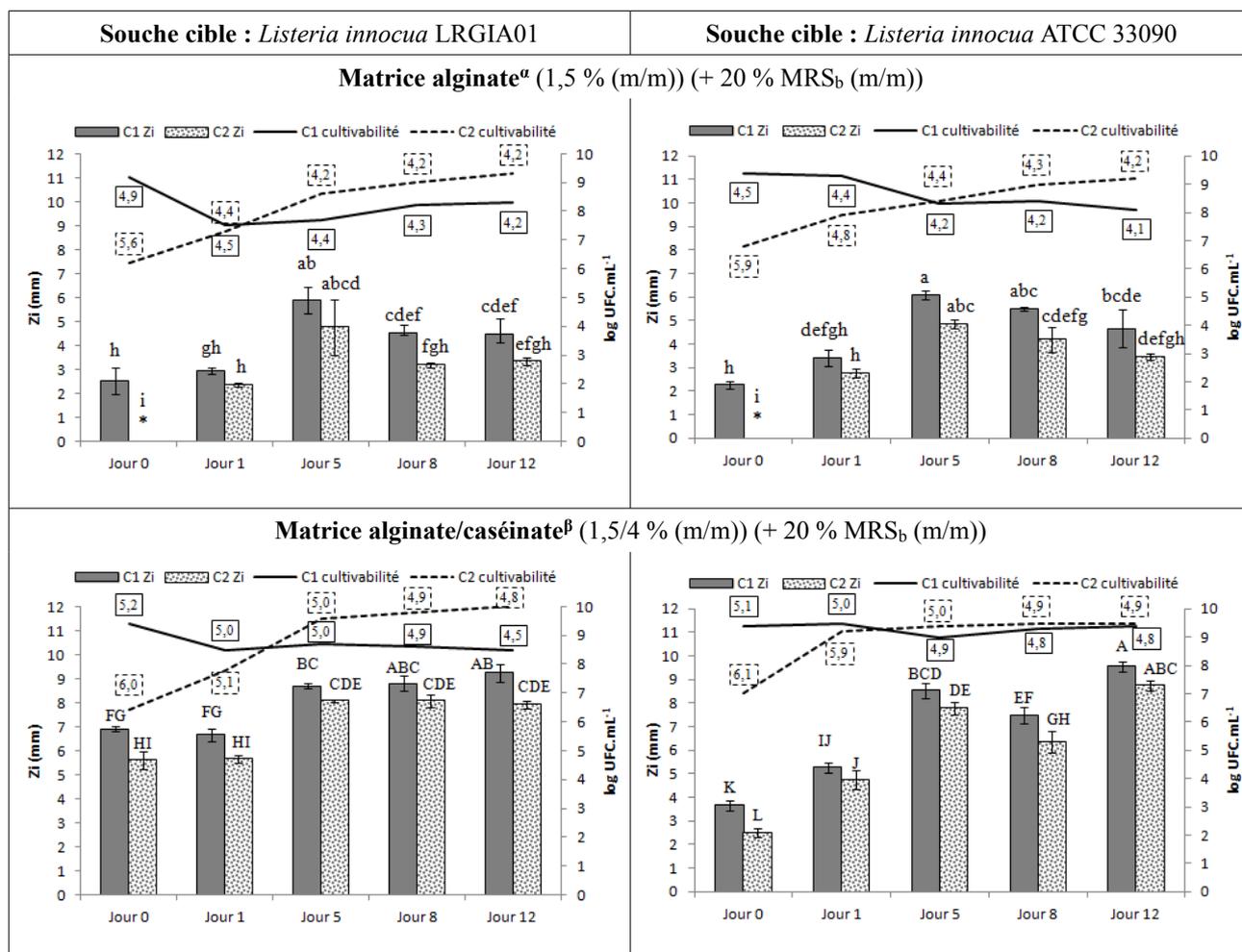


Figure 5.3 Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB1 incorporées dans les matrices polymériques liquides stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.

α , β : Les résultats obtenus dans les matrices alginate et alginate/caséinate forment deux groupes statistiquement différents d'après le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Pour une même composition de matrice, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

C1, charge initiale en cellules de LAB1 de 10^{10} UFC.mL⁻¹ ; C2, charge initiale en cellules de LAB1 de 10^5 UFC.mL⁻¹.

Les valeurs de pH sont données le long des courbes de cultivabilité encadrées.

* : aucune zone d'inhibition observée.

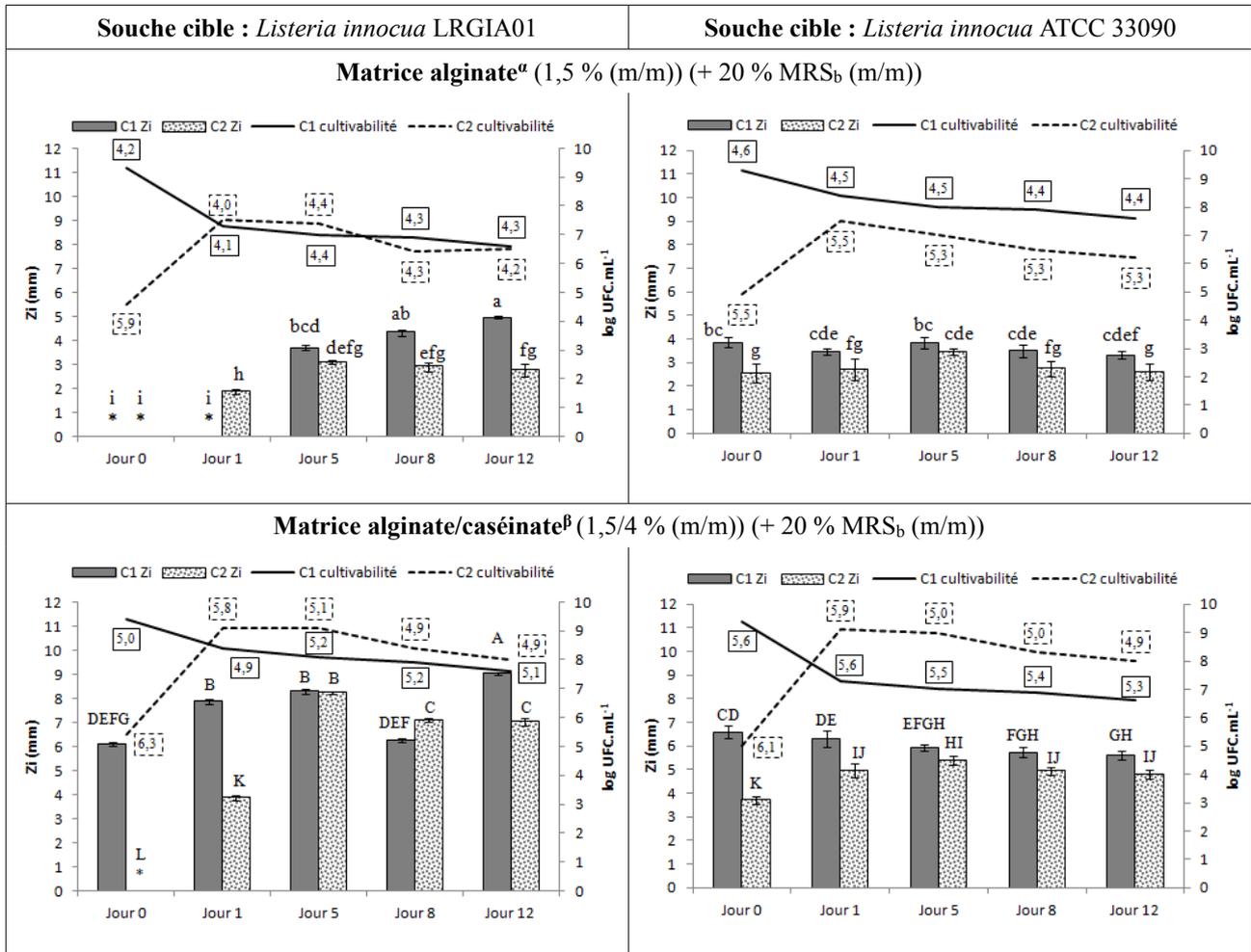


Figure 5.4 Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB2 incorporées dans les matrices polymériques liquides stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.

α , β : Les résultats obtenus dans les matrices alginate et alginate/caséinate forment deux groupes statistiquement différents d'après le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Pour une même composition de matrice, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

C1, charge initiale en cellules de LAB2 de 10^9 UFC.mL⁻¹ ; C2, charge initiale en cellules de LAB2 de 10^5 UFC.mL⁻¹.

Les valeurs de pH sont données le long des courbes de cultivabilité encadrées.

* : aucune zone d'inhibition observée.

Le suivi de la croissance de LAB1 et LAB2 (**Figure 5.3** et **Figure 5.4**) a permis de montrer que les deux souches survivaient dans la matrice alginate/caséinate et alginate seul en présence de MRS_b. La charge initiale microbienne C1 de LAB1 s'est maintenue à 10^{8-10} UFC.mL⁻¹ dans les matrices alg et alg/cas pendant 12 jours alors que celle de LAB2 a chuté à 10^{6-7} UFC.mL⁻¹ dans la matrice alg et à 10^{7-8} UFC.mL⁻¹ dans la matrice alg/cas. Bevilacqua *et al.* (2010) ont étudié la survie d'une population de *Lactobacillus plantarum* dans un gel d'alginate avec une charge initiale de 10^{7-8} UFC.mL⁻¹. A 30°C, la population s'est stabilisée pendant 8 jours avant de chuter à 10^1 UFC.mL⁻¹ après plus de 15 jours.

Avec la charge initiale C2, une multiplication des cellules de LAB1 a été observée sur 24 à 48h pour atteindre la même charge que dans les matrices chargées initialement avec C1. Différemment de ce qui a été observé pour la souche *Lactococcus lactis* LAB3, la population présente dans les matrices initialement chargées avec C2 se maintient mieux à 1 log supérieur pendant les 12 jours par rapport à la population des matrices initialement chargées avec C1. Les cellules de LAB1 chargées avec C1 pourraient être sujettes à des mécanismes d'auto-inhibition : accumulation d'acide lactique ou d'autres métabolites toxiques, épuisement des nutriments (Leroy et De Vuyst, 2001). Tomas *et al.*, en 2003, ont montré que le métabolisme oxydatif de deux souches, *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 et *Lactobacillus crispatus* CRL 1266 était à l'origine de phénomène d'auto-inhibition. Leroy et De Vuyst, en 2001, ont établi un modèle concernant l'épuisement en nutriments pendant une culture dans un milieu MRS pour *Lactobacillus sakei* CTC 494. Selon eux, l'acide lactique ne peut pas expliquer seul la réduction du taux de croissance au cours du temps, spécifiquement pour une valeur de pH de 6,5 où très peu de molécules d'acide lactique sous leur forme non-dissociée toxique sont présentes. Loubiere *et al.*, en 1997, avançaient déjà cette hypothèse : l'acide lactique (produit par une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) ne serait théoriquement responsable que de 6 % du phénomène d'auto-inhibition dans un milieu synthétique MS10.

Concernant la souche LAB2, la population des matrices initialement chargées avec C2 a augmenté sur 24h pour atteindre la même charge que dans les matrices chargées initialement avec C1. Le comportement des deux populations est ensuite semblable du jour 1 au jour 12, comme observé pour la souche LAB3.

En comparant les comportements de cultivabilité des deux souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2, des différences ont pu être notées entre les deux souches : la souche LAB2 a montré un comportement proche de celui déjà observé pour la souche *Lactococcus lactis*

LAB3 alors que la population de la souche LAB1 a montré une évolution quelque peu différente. De plus, pour la souche LAB2, une différence de cultivabilité est apparue entre les matrices alginate et alg/cas avec une différence d'au moins 1 log en faveur des matrices bi-polymériques. Cette différence a également été mise en évidence pour la souche de *Lactococcus lactis* LAB3. Gialamas *et al.*, en 2010, avait également observé un effet positif du caséinate de sodium sur la survie de *Lactobacillus sakei* dans leurs films. Concernant la souche LAB1, la cultivabilité a été identique que ce soit dans les matrices alginate ou alg/cas.

Ces observations montrent la complexité pour généraliser des conclusions. En effet, les comportements de deux souches de *Lactobacillus paracasei*, plus proches phylogénétiquement, s'avèrent être différents alors que les comportements de LAB2 et LAB3, deux souches d'espèces différentes, sont semblables (meilleure cultivabilité au cours du temps dans les matrices alg/cas et même comportement entre les charges C1 et C2 du jour 1 au jour 12).

Les valeurs de pH des matrices relevées sur les 12 jours décrivent les mêmes tendances qu'observées précédemment pour la souche *Lactococcus lactis* LAB3 :

- pour la charge C1, pH ~ 4,0 dans les matrices d'alginate et pH ~ 5,0 dans les matrices d'alg/cas dès l'incorporation et constant sur les 12 jours ;
- pour la charge C2, pH ~ 6,0 à J0 quel que soit le type de matrice (alg ou alg/cas) puis même tendance que pour la charge C1 de J1 à J12.

Les matrices avec la charge initiale C1 sont acidifiées dès l'incorporation des cellules. Cette diminution du pH est engendrée par la production d'acides organiques (comme l'acide lactique) par les cellules de LAB. Avant leur incorporation, les cellules ont été lavées à trois reprises dans un milieu neutre, un bouillon Tryptone-Sel. Ces lavages n'ont pas dû éliminer les acides organiques contenus dans le milieu cytoplasmique. Ces acides seraient libérés dès l'incorporation dans les matrices pour ré-équilibrer les systèmes. En effet, les cellules de LAB maintiennent le pH du milieu cytoplasmique à un pH plus alcalin que le milieu extérieur d'environ 1 unité de pH. Par exemple, lorsque le milieu cytoplasmique a un pH de 4,4 pour des lactobacilles, le pH du milieu extérieur est de 3,5 (Kashket, 1987).

La capacité à tamponner le milieu des caséinates est confirmée permettant de maintenir un pH aux alentours de 5,0 alors que dans les matrices d'alginate, le pH est d'environ 4,0. Ce pH moins acide dans les systèmes alg/cas pourrait réduire le stress acide des cellules de LAB favorisant ainsi une meilleure survie. En effet, même si les cellules de LAB possèdent plusieurs mécanismes de

réponses à un stress acide (expulsion de protons du cytoplasme via une ATPase, réactions de décarboxylation, réactions de désamination/amidation, conversion de glutamine en glutamate, déviation du métabolisme du pyruvate) (Serrazanetti *et al.*, 2009), elles sont sensibles aux changements de pH le temps que ces mécanismes se mettent en place. Par exemple, la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* LD61 ne se développe plus à pH = 4,7 dans le lait (Cretenet *et al.*, 2011). Bauer *et al.* (2012) ont, quant à eux, abaissé le pH à une valeur de 4,5 pour placer la souche *Lactobacillus paracasei* dans les conditions d'un stress acide. Dans notre cas, en considérant nos valeurs de pH entre 4,0 et 5,0 selon la matrice, les cellules de LAB subiraient donc bien un stress acide. Cretenet *et al.*, en 2011, ont fourni un ensemble de données sur le stress acide de la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* LD61 dans un fromage pendant 7 jours. Le stress a été progressif ce qui a permis à la souche de mettre en place des stratégies multiples : entre 2h et 24h, ~530 gènes se sont exprimés différemment par rapport à une croissance dans des conditions « classiques », puis entre 24h et 7 jours, ~200 gènes se sont exprimés différemment. De plus, le niveau de stress dans leur système est resté assez faible puisque le pH a été maintenu à une valeur de 5,9. De plus, un point intéressant a été relevé par ces auteurs : l'activité protéolytique de la souche a généré des acides aminés dans le milieu qui ont contribué à son alcalinisation contrariant le phénomène d'acidification. Dans notre cas, en présence de caséinate, si nos souches ont des activités protéolytiques, cela pourrait participer à l'effet tampon observé.

Les matrices alg/cas et alginate liquide contenant les cellules des souches LAB1 et LAB2 ont également été testées pour leur activité anti-*Listeria* vis-à-vis de *Listeria innocua* LRGIA01 et *innocua* ATCC 33090 (**Figures 5.3 et 5.4**).

- Vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA01

Les différents types de matrices ont montré une activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 significatives au cours du temps.

Pour chaque charge microbienne, C1 et C2, l'effet antimicrobien des matrices alg/cas et alg a été comparé. Précédemment, il a été montré que la viabilité des cellules de LAB2 est indépendante de la charge initiale après 24h, alors que celle de LAB1 est plus importante d'1 log environ dans les matrices initialement chargées avec C2 après les 24 ou 48 premières heures. Concernant l'inhibition, comme cela a été observé pour LAB3, elle dépend de la charge initiale. Elle apparaît

plus importante lorsque la charge initiale des souches est élevée. En effet, dans la matrice alg/cas dès J0, pour LAB1 avec C1 (10^{10} UFC.mL⁻¹), une zone d'inhibition de $6,90 \pm 0,10$ mm a été observée augmentant progressivement jusqu'à $9,23 \pm 0,38$ mm au jour 12 avec une charge de $8,5 \log$ UFC.mL⁻¹. Pour LAB2 (C1 10^9 UFC.mL⁻¹), dans la matrice alg/cas dès J0, une zone de $6,10 \pm 0,10$ mm a été observée augmentant progressivement jusqu'à $8,30 \pm 0,10$ mm au jour 5 avec une charge de $8,1 \log$ UFC.mL⁻¹. La population de LAB présente serait donc à lier à cette activité antimicrobienne. Néanmoins, dans certains cas, l'activité antimicrobienne et la densité cellulaire n'évoluent pas de la même façon. Par exemple, pour la charge initiale C1, pour LAB1, le diamètre à J0 est de $2,50 \pm 0,45$ mm puis, il augmente jusqu'à J5 en atteignant $5,90 \pm 0,45$ mm et enfin il diminue jusqu'à $4,40 \pm 0,51$ mm à J12. Cette diminution intervient alors que la population microbienne augmente d'environ 1 log. Celle-ci pourrait être due à une perte de certains agents antibactériens. En effet, les agents de nature protéique pourraient être dégradés par les activités protéolytiques des cellules (Miller et Bassler, 2001).

De la même façon que précédemment avec la souche LAB3, les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les matrices d'alginate sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus avec les matrices d'alg/cas. Les résultats forment deux groupes statistiquement différents ($p < 0,05$). Cela confirmerait une nouvelle fois que la présence de caséinate favoriserait la libération des molécules antimicrobiennes produites par des souches de LAB. Pour la souche LAB1, notamment, cette différence ne pourrait pas être due à un effet « population » puisque la cultivabilité est semblable dans les matrices alginate et alg/cas.

De plus, l'inhibition de *L. innocua* LRGIA01 par les deux types de matrices alg/cas et alg est plus importante pour celles contenant les cellules de LAB1 par rapport à celles contenant les cellules de LAB2. Ne produisant pas les mêmes métabolites antimicrobiens (Chapitre 3), il semble logique que les souches de *Listeria* ne répondent pas de la même façon en fonction de la souche de LAB qui est présente en face d'elle. En effet, la pré-caractérisation des métabolites antimicrobiens a montré que l'activité antimicrobienne de LAB1 et LAB2 est en grande partie due à des peptides thermolabiles qui pourraient être considérés comme des bactériocines de classe III ou IV. Néanmoins, l'activité des surnageants de culture de LAB1 s'est avérée sensible à l'action de la protéase d'*Aspergillus oryzae* alors que celle des surnageants de culture LAB2 est restée intacte après le même traitement.

Une deuxième hypothèse peut être avancée : contrairement aux molécules antimicrobiennes produites par les cellules de LAB1, celles produites par les cellules de LAB2 ne sont pas libérées de

la même façon, avec peut-être des cinétiques plus lentes.

De J1 à J12, les zones d'inhibition obtenues avec les charges initiales C1 et C2 quel que soit le type de matrice ne forment pas deux groupes statistiquement différents. À J0, le cas est différent, l'activité dépend de la charge initiale : si les cellules sont incorporées à la charge C1, elles n'ont qu'à maintenir la population et produisent alors instantanément des actifs antimicrobiens. Lorsqu'elles sont incorporées à la charge C2, il y a, préalablement à la production d'actifs antimicrobiens, une phase de multiplication de 24 à 48h.

- Vis-à-vis de *L. innocua* ATCC 33090

Les activités anti-*Listeria* ATCC 33090 de LAB1 et LAB2 avec la charge initiale C1 montrent les mêmes tendances que les activités anti-*Listeria* LRGIA01. L'effet inhibiteur des LAB1 dans la matrice alg/cas, montre dès J0 une zone d'inhibition de $3,66 \pm 0,17$ mm qui augmente à $8,50 \pm 0,17$ mm à J2 puis, qui se stabilise à une valeur de $9,50 \pm 0,17$ mm à J12.

Comparant les deux tests anti-*Listeria* LRGIA01 et anti-*Listeria* ATCC 33090 de LAB2 à la charge initiale C2, la souche LRGIA01 est moins sensible (pas d'inhibition) aux molécules libérées par LAB2 au cours de la multiplication cellulaire (premières 24h) par rapport à la souche ATCC 33090. Après ce stade de croissance bactérienne (48h) des LAB, la souche LRGIA01 devient plus sensible à la présence de LAB2. Les molécules antimicrobiennes produites et libérées en premier (acides organiques) auraient donc un effet plus important sur la souche ATCC 33090 que sur la souche LRGIA01. Quelle que soit la nature de l'agent antimicrobien, l'inhibition dépend du microorganisme cible (Richard, 1996 ; Ramos *et al.*, 2012). Lehrke *et al.*, 2011, ont testé la sensibilité de deux acides organiques (acide lactique et acide citrique) sur deux souches de *Listeria innocua* (CIP 80.11 et ATCC 33090) et leurs sensibilités ont été significativement différentes ($p < 0,05$).

L'immobilisation des cellules dans le cas des trois souches de LAB sélectionnées, LAB1/LAB2/LAB3, permet une libération continue sur 12 jours des substances anti-*Listeria*. Des différences de comportements sont apparues en fonction de la souche bioprotectrice, du type de matrice et de la souche cible. En effet, la production et la libération de molécules antimicrobiennes par les souches de LAB sont connues pour être variables avec des facteurs tels que la composition du substrat, la densité cellulaire et la cinétique de population (Tagg et Wannamaker, 1978 ; Holck *et al.*, 1992 ; Stoyanova et Levina, 2006). Néanmoins, des tendances observées sur au moins deux

souches à la fois peuvent être énoncées :

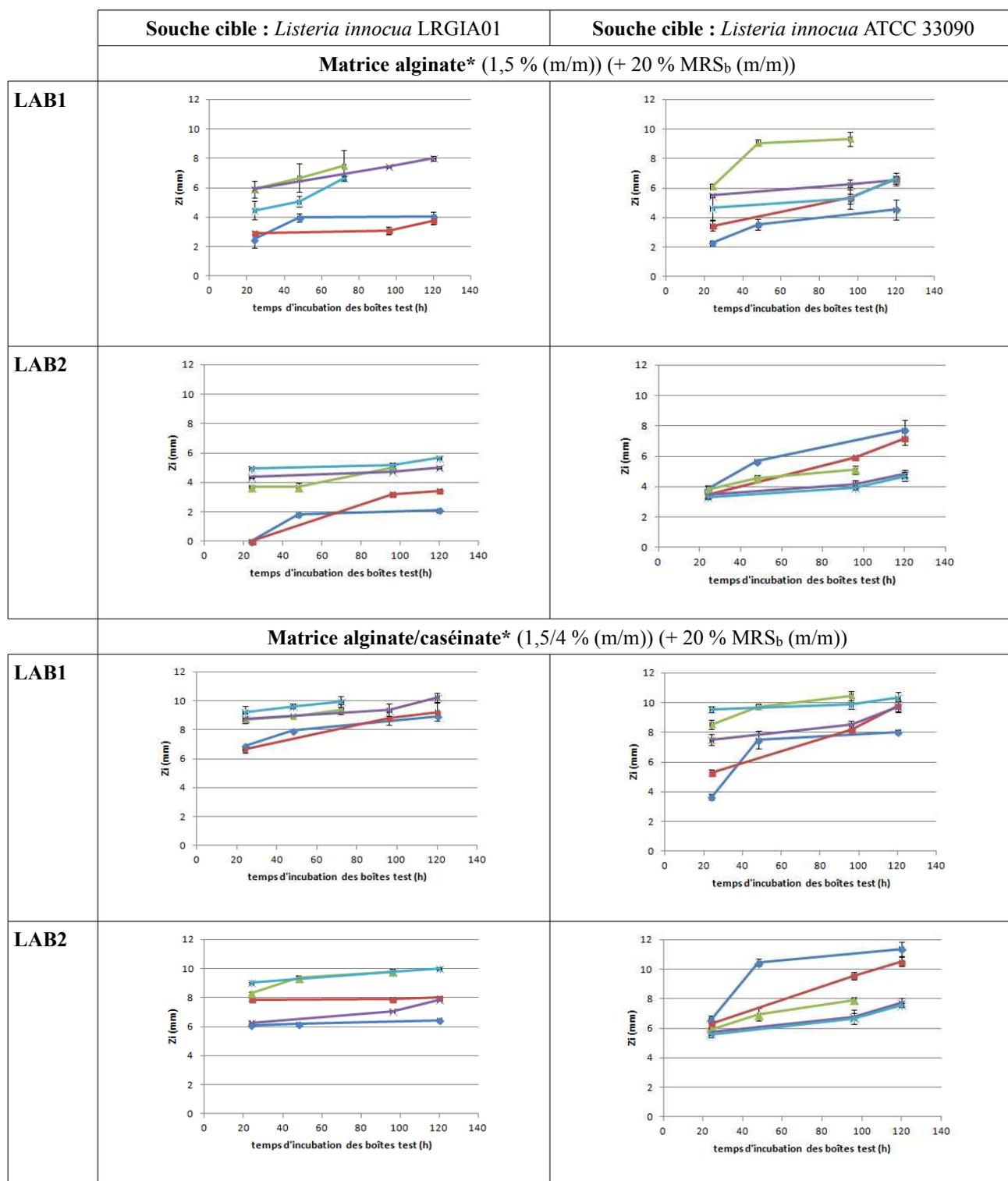
- une meilleure cultivabilité dans les matrices alg/cas ;
- une meilleure activité antimicrobienne dans les matrices alg/cas ;
- une modulation de l'activité antimicrobienne sur les premières 24h possible en jouant sur la charge initiale.

Les zones d'inhibition qui viennent d'être présentées ont été mesurées après 24h d'incubation des boîtes test pour permettre la croissance de *Listeria* spp. Même si ces boîtes ont été préalablement placées à 4°C pendant 3h pour permettre la diffusion des substances antibactériennes des matrices vers la gélose, il a été remarqué qu'en 24h, la diffusion des actifs n'était pas complète. Les boîtes ont alors également été lues après 48, 72, 96 jusqu'à 120h pour certaines afin d'étudier l'impact sur les activités antimicrobiennes de la diffusion des actifs antimicrobiens des matrices vers la gélose.

5.1.1.2 Libération des actifs antimicrobiens en fonction du temps

Lorsque les zones d'inhibition sont mesurées au-delà des 24h d'incubation de *Listeria* spp., une augmentation du diamètre est observée quelle que soit la souche de LAB, la souche cible et le type de matrice (alg ou alg/cas) (**Figure 5.5**). Cette augmentation reflète la libération progressive des actifs antimicrobiens contenus dans les matrices. De plus, il se peut que les cellules de LAB continuent à produire des actifs antimicrobiens pendant ce temps d'incubation. Après 24h d'incubation des boîtes de test, il n'y a pas eu d'inhibition de *Listeria innocua* LRGIA01 par la souche LAB2 à J0 et J1, alors qu'après 120h à 30°C d'incubation des boîtes de test, des zones ont été visibles de $2,12 \pm 0,08$ mm à J0 et $3,45 \pm 0,20$ mm à J1 (**Figure 5.5**). Les échantillons du jour 0 présentent un profil différent des autres jours qui sont plus linéaires. Les métabolites antimicrobiens libérés à J0 et aux autres jours sont, peut-être, de nature différente. Quelle que soit la charge C1 ou C2, ces profils sont identiques (données non montrées).

Ces profils ont été réalisés pour une même concentration en agar dans le milieu gélosé et une même charge initiale en cellules de la souche cible.



◆ C1j0 ■ C1j1 ▲ C1j5 ✖ C1j8 ◆ C1j12

Figure 5.5 Libération des actifs antimicrobiens des matrices polymériques liquides (chargée initialement avec C1) contenant des cellules de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 vers la gélose : mesure des diamètres des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation des boîtes test vis-à-vis de deux souches de *Listeria innocua* (n=3).

Les études concernant la libération d'actifs antimicrobiens d'une matrice vers un milieu donné visant à la bioprotection ont généralement été menées pour la nisine (dans l'agar (Blom *et al.*, 1997), dans l'agarose (Sebti *et al.*, 2004), dans un milieu modèle de fromage (Aly *et al.*, 2011)). Sebti *et al.*, en 2004, ont montré que la diffusion de la nisine dans l'agarose suivait la deuxième loi de Fick. Néanmoins de nombreux facteurs peuvent intervenir. Blom *et al.*, en 1997, ont comparé la diffusion de la nisine dans l'agar (en mesurant les diamètres des zones d'inhibition) en fonction de plusieurs facteurs intrinsèques : le pH, la charge en cellules cibles, la concentration en acides gras, en NaCl, et en agar. Les diamètres des zones d'inhibition de la nisine ont diminué avec l'augmentation des valeurs de pH, de la charge en cellules cibles et de la concentration en agar. Ils ont également croisé l'effet des facteurs deux à deux et les diamètres des zones d'inhibition ont augmenté lorsque la charge en cellules et la concentration en agar sont élevées. Cette étude montre toute la complexité du phénomène. De plus, en testant 5 bactériocines différentes (pediocine PA-1, piscicoline, sakacine P, nisine, sakacine A), ils ont obtenu des profils de réponses différents pour chacune d'entre elle.

Dans notre cas, une multitude d'actifs antimicrobiens sont produits au cours du temps, il est difficile de tirer des conclusions, hormis que la libération est continue sur au moins 120h. D'un point de vue applicatif, cet aspect n'est pas à négliger permettant une action sur les souches cibles durable dans le temps. Pour une même souche cible, et une même souche de LAB, les profils de libération sont semblables entre les matrices d'alginate et d'alginate caséinate entre 24h et 120h. Néanmoins, comme vu précédemment, l'activité antimicrobienne présente après une incubation de 24h reste meilleure pour les matrices d'alginate/caséinate. La désorption des actifs antimicrobiens est plus rapide sur les premières 24h pour les matrices d'alginate/caséinate. Entre 24h et 120h, l'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition est du même ordre entre matrices d'alginate et d'alginate/caséinate. Par exemple, à J8, le diamètre des zones d'inhibition obtenues pour les matrices contenant les cellules de LAB1 contre *L. innocua* LRGIA01 augmente de 2 mm pour les deux compositions de matrices.

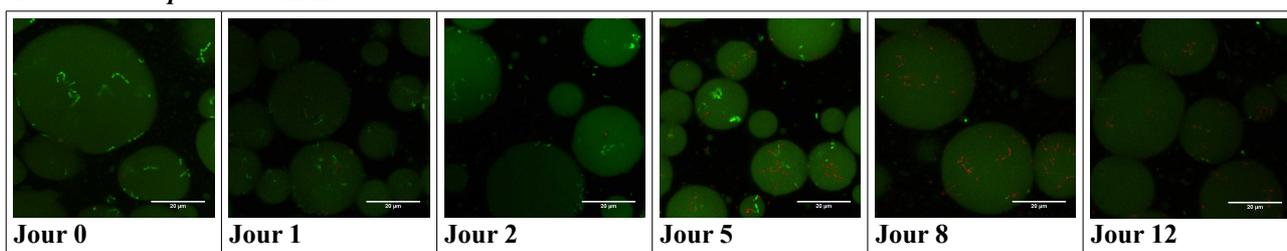
L'activité antimicrobienne des matrices polymériques incluant les cellules de LAB dépend donc à la fois du mécanisme de désorption des actifs antimicrobiens de la matrice et de la diffusion dans le gel d'agar contaminé (qui devrait simuler une matrice alimentaire). Un autre élément à étudier est le suivi de la localisation des cellules dans les matrices polymériques au cours du temps. En effet, dans le chapitre 4, la localisation préférentielle des cellules de LAB dans la phase protéique a été démontrée immédiatement après incorporation. De la même façon, la microstructure des mélanges

alg/cas chargés initialement avec la plus forte concentration cellulaire (C1) a été suivie sur 12 jours avec un stockage à 30°C.

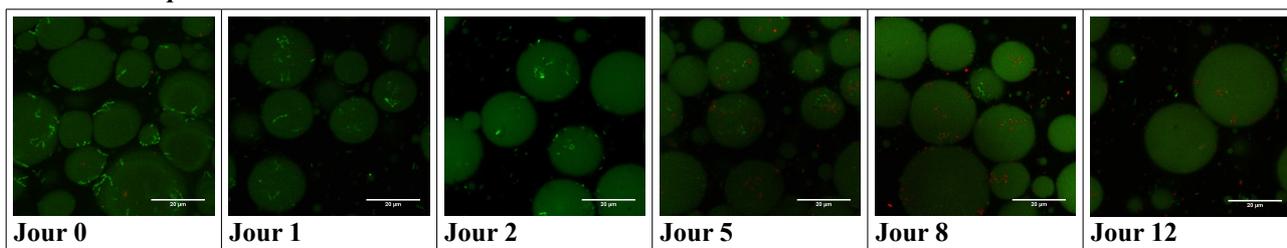
5.1.1.3 Suivi de la microstructure des matrices polymériques alginate/caséinate et de la répartition des cellules dans les phases alginique et protéique

Cette étude en microscopie a permis de déterminer la répartition entre la phase alginique et protéique des cellules viables et non viables au cours du temps, par un marquage des cellules avec le kit BacLight Live/Dead[®]. De plus, les données de viabilité (déterminée à partir des images de microscopie) et de cultivabilité (dénombrement classique sur boîte de Pétri) ont pu être comparées. La **Figure 5.6** présente les images de microstructures des mélanges alg/cas liquides avec la composition type pour les 3 souches de LAB sélectionnées.

Lactobacillus paracasei LAB1



Lactobacillus paracasei LAB2



Lactococcus lactis LAB3

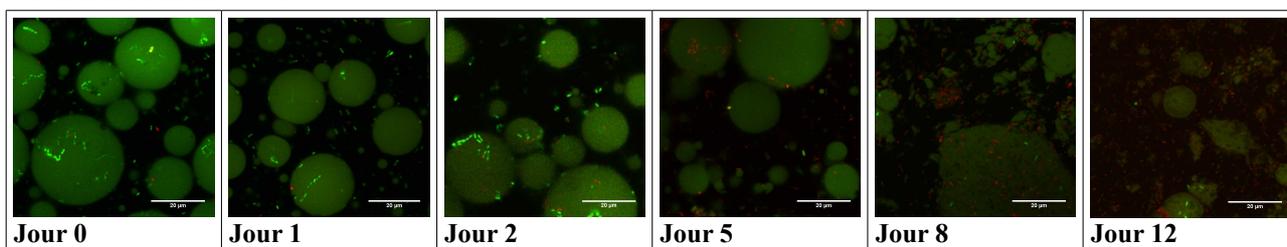


Figure 5.6 Observations microscopiques en MCBL des cellules de LAB (marquées par le kit BacLight Live/Dead[®]) dans les matrices alg/cas liquides stockées 12 jours à 30°C.

Matrice alg/cas : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 4 % (m/m) de caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Pour les deux souches de *Lactobacillus paracasei*, la microstructure du système de type émulsion reste inchangée pendant les 12 jours. Par contre, pour la souche de *Lactococcus lactis* LAB3, les gouttelettes de caséinates deviennent irrégulières et plus morcelées comme si les cellules avaient consommé cette source d'azote entre le jour 5 et le jour 8. L'activité protéolytique des cellules de LAB ont été mises en avant principalement pour l'espèce *Lactococcus lactis* (Hugenholtz et Kleerebezem, 1999). La souche *Lactococcus lactis* LAB3 pourrait donc faire partie de ces souches de *Lactococcus lactis* qui sont capables de se servir des caséinates comme une source d'azote, expliquant ainsi la déstructuration de la matrice polymérique alg/cas. Pour les deux souches de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2, l'observation de la microstructure sur 12 jours de la matrice polymérique alg/cas ne permet pas d'apporter d'éléments sur un tel mécanisme.

La réalisation d'un programme d'analyse d'images avec le logiciel Volocity 6.2.1[®] (PerkinElmer, Etats-Unis) a permis de compter les cellules viables et non viables (mises en évidence par le marquage en fluorescence) présentes dans la phase protéique et alginique au cours du temps en discriminant chacune de ces phases (**Figure 5.7**).

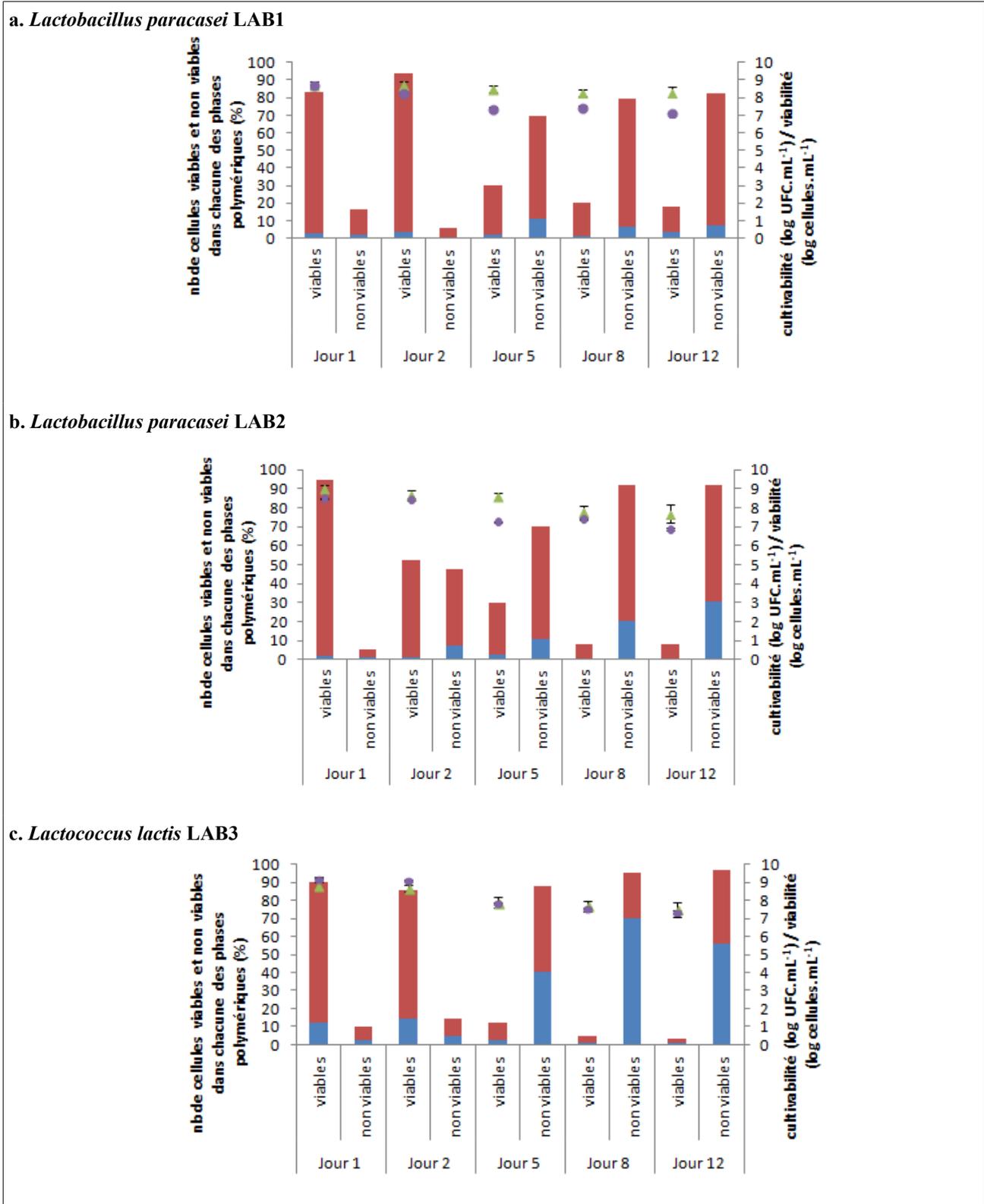


Figure 5.7 Répartition des cellules de LAB dans la phase alginate et protéique des mélanges alg/cas stockés 12 jours à 30°C et comparaison cultivabilité/viabilité.

Matrice alg/cas : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 4 % (m/m) de caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

■ dans phase cas ■ dans phase alg ▲ viabilité ● cultivabilité

Sur les 48 premières heures, les cellules viables dominent et sont clairement dans la phase protéique pour les 3 souches. À partir du jour 5, il y a une inversion, le pourcentage de cellules non viables devient plus élevé. Néanmoins, le peu de cellules viables reste localisé dans la phase protéique. Les cellules non viables quant à elle ont une répartition plus aléatoire et différente en fonction de la souche. Pour les coques LAB3, la répartition des cellules non viables est aléatoire. De plus, entre jour 5 et jour 8, la phase protéique se désorganise, libérant peut-être des cellules plus facilement dans la phase alginique que si la structure était restée intacte. Pour les bacilles LAB1 et LAB2, les cellules non viables restent majoritairement localisées dans la phase protéique. Cela peut être dû au fait que la structure reste inchangée sur les 12 jours, les cellules de Lactobacilles même non viables restent dans les gouttelettes de caséinates.

La détermination de la viabilité des cellules par le marquage permet aussi de comparer le résultat avec celui obtenu par dénombrement sur milieu gélosé. En effet, le dénombrement sur milieu gélosé peut mener à une sous-estimation de la population bactérienne (Zotta *et al.*, 2009). Celle-ci peut être due à la formation de chaînes ou de massifs de cellules mais aussi à l'apparition de cellules dites viables non-cultivables (VNC) suite à l'exposition à un stress. Ces cellules VNC peuvent être définies comme des cellules qui ne sont pas cultivables sur des milieux microbiologiques standards car elles sont incapables de supporter le mécanisme de division cellulaire exigé pour former des colonies régulières sur un milieu gélosé. Néanmoins, elles maintiennent un potentiel d'activité métabolique au niveau de la cellule unique (Zotta *et al.*, 2009). Cette population de cellules VNC peut apparaître à la suite d'un stress, les cellules ayant subi des modifications non létales comme des dommages au niveau de la membrane cellulaire ou une perméabilisation de la membrane réversible ou éphémère (Rault *et al.*, 2007).

Pour la souche de *Lactococcus lactis* LAB3, les valeurs de viabilité et de cultivabilité sont confondues (**Figure 5.7**). En revanche, pour les deux souches de *Lactobacillus paracasei*, il y a généralement 1 log de différence en faveur du nombre de cellules viables (déterminé par comptage en microscopie après marquage avec le kit Live/Dead) par rapport au nombre de cellules cultivables (déterminé par le dénombrement sur gélose). D'autres auteurs ont rapporté une viabilité estimée par microscopie généralement plus importante que celle déterminée par dénombrement sur milieu gélosé (Auty *et al.*, 2001 ; Mesa *et al.*, 2003 ; Baena-Ruano *et al.*, 2006 ; Gatti *et al.*, 2006 ; Moreno *et al.*, 2006). Moreno *et al.*, en 2006, ont montré par leurs résultats que le dénombrement sur milieu gélosé donnait des valeurs de viabilité dix fois plus faibles en comparaison d'un comptage par marquage fluorescent en microscopie. Les cellules de LAB confinées dans les matrices

polymériques sont exposées à certains stress comme par exemple le stress acide (pH compris entre 5 et 4 selon la composition de la matrice). Néanmoins, en-dessous d'un pH = 5, la plupart des LAB sont capables de mettre en œuvre un système de Tolérance à l'Acide (TA) qui leur permet de survivre et de continuer à faire fonctionner leur métabolisme (Van de Guchte *et al.*, 2002). La différence entre le nombre de cellules viables et cultivables pour les souches de *Lactobacillus paracasei* pourrait alors représenter le nombre de cellules VNC. Cette nouvelle population peut être un mécanisme de réponse aux changements de conditions environnementales (Hayes et Low, 2009). Le double marquage du kit Live/Dead, discriminant les cellules viables des cellules mortes sur la base de leur intégrité membranaire, a été utilisé avec succès dans de nombreuses études sur différentes cultures microbiologiques (Zotta *et al.*, 2009). Cependant, des nuances ont pu être apportées par Zotta *et al.* (2009) : même s'ils ont trouvé une concordance des résultats entre la viabilité mesurée par marquage fluorescent et celle mesurée par un dénombrement sur milieu gélosé pour des cellules ayant subi un stress osmotique ou acide, la mesure de la viabilité via le marquage a donné une valeur sous-estimée pour des dommages causés par un stress oxydatif en comparaison toujours à un dénombrement sur milieu gélosé.

Les deux méthodes utilisées ici pour le comptage des cellules de LAB confinées dans les matrices ont révélé la complexité de l'état physiologique des cellules et l'hétérogénéité des populations dans une culture. De plus, elles ont également permis d'éviter les sous-estimations ou, du moins, de vérifier les résultats obtenus par la méthode de dénombrement en gélose.

5.1.2 Libération des actifs antimicrobiens : activité anti-Listeria des surnageants de culture des souches de LAB sélectionnées incorporés dans les matrices d'alginate, de caséinate et d'alginate/caséinate liquides, production des actifs antimicrobiens ex situ

Les matrices alg/cas incorporant des cellules de LAB ont montré un potentiel bioprotecteur plus important que les matrices alginiques. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : une population bactérienne plus élevée et/ou une meilleure libération des composés antimicrobiens de la matrice vers le gel de gélose. Pour vérifier cette dernière hypothèse, les surnageants de culture de LAB ont été ajoutés aux matrices alg et alg/cas et leur activité antimicrobienne contre *Listeria* spp. a été déterminée par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé.

5.1.2.1 Activité antimicrobienne des matrices liquides d'alginate et d'alginate/caséinate incorporant des surnageants de culture de *Lactococcus lactis* LAB3 récupérés à différents temps de culture

Les surnageants de culture de la souche *Lactococcus lactis* LAB3 (récupérés à partir d'une culture à 7, 9, et 24h, dans MRS_b à 30°C en conditions d'anaérobie) ont été incorporés à 20 % (m/m) dans des matrices liquides d'alginate et d'alginate/caséinate. Leurs activités antimicrobiennes respectives ont été déterminées par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé (**Tableau 5.1**). De plus, la comparaison de l'incorporation de surnageants natifs et de surnageants neutralisés a permis également d'obtenir des informations concernant la contribution des acides organiques et des autres métabolites antimicrobiens (probablement des composés de type bactériocines (d'après la discussion du chapitre 3)).

Pour interpréter ces résultats, l'addition de deux phénomènes est à prendre en compte :

- (1), la libération des métabolites antimicrobiens des matrices polymériques vers le milieu gélosé ;
- (2), la diffusion des métabolites antimicrobiens dans le milieu gélosé.

En effet, comme attendu, les diamètres des zones d'inhibition sont beaucoup plus faibles que ceux mesurés après l'action directe des surnageants de culture (Chapitre 3.), car seulement 20 % (m/m) de surnageant a été incorporé dans les matrices. Pour rappel, un surnageant de *Lactococcus lactis* LAB3 (récupéré à 24h d'une culture dans MRS_b à 30°C en conditions d'anaérobie) a donné une zone d'un diamètre compris entre 14 et 16 mm contre *L. monocytogenes* S162. De plus, dans le cas de l'incorporation du surnageant dans la matrice, les interactions entre molécules antimicrobiennes et alginate ou alginate/caséinate peuvent limiter ou entraver leur libération de la matrice vers le milieu gélosé.

Tableau 5.1 Activité antimicrobienne contre *Listeria innocua* LRGIA01 et *Listeria monocytogenes* S162 des matrices liquides incorporant des surnageants de culture de *Lactococcus lactis* LAB3.

Matrice	Surnageant	Temps (h)	pH	Zi (mm)	
				<i>L. innocua</i> LRGIA01	<i>L. monocytogenes</i> S162
Alginate ^a	Natif	7	4,9	2,52 ± 0,20 ^d	3,91 ± 0,21 ^c
		9	4,7	3,52 ± 0,50 ^{cd}	5,11 ± 0,38 ^b
		24	4,3	3,31 ± 0,46 ^{cd}	5,57 ± 0,26 ^b
	Neutralisé	7	7,1	2,48 ± 0,08 ^d	3,17 ± 0,42 ^{cd}
		9	6,8	3,07 ± 0,33 ^{cd}	5,13 ± 0,50 ^b
		24	6,8	2,71 ± 0,39 ^d	6,83 ± 0,53 ^a
Alginate-caséinate ^β	Natif	7	5,8	3,99 ± 0,25 ^f	4,99 ± 0,32 ^e
		9	5,6	5,03 ± 0,41 ^e	6,35 ± 0,16 ^{b'c'}
		24	5,3	5,35 ± 0,01 ^{d'e'}	6,45 ± 0,19 ^{b'}
	Neutralisé	7	6,6	0,00 ± 0,00 ^g	4,79 ± 0,20 ^e
		9	6,6	4,95 ± 0,28 ^e	6,81 ± 0,11 ^{a'b'}
		24	6,6	5,71 ± 0,20 ^{c'd'}	7,34 ± 0,16 ^{a'}

Les surnageants de culture ont été récupérés à 7 (début de phase exponentielle), 9 (milieu de phase exponentielle) et 24 h (phase stationnaire), d'une culture dans MRSb à 30°C en conditions d'anaérobiose.

Matrice alginate : 1,5 % (m/m) alginate de sodium + 20 % (m/m) surnageant de culture.

Matrice alginate/caséinate : 1,5 % (m/m) alginate de sodium + 4 % (m/m) caséinate de sodium + 20 % (m/m) surnageant de culture.

α, β : Les résultats obtenus dans les matrices alginate et alginate/caséinate forment deux groupes statistiquement différents d'après le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Pour une même composition de matrice, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Comme observé précédemment concernant l'activité antimicrobienne directe des surnageants de culture (Chapitre 3), les diamètres d'inhibition augmentent ou se stabilisent lorsque le temps de prélèvement du surnageant augmente. Les deux diminutions apparentes contre la souche de *L. innocua* LRGIA01 pour l'activité des matrices d'alginate avec les surnageants à 9 et 24h ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$) et les activités sont donc considérées comme constantes. Les activités antimicrobiennes des matrices d'alginate vis-à-vis de la souche *L. innocua* LRGIA01 sont donc semblables quel que soit le temps de prélèvement du surnageant incorporé.

Les zones d'inhibition obtenues avec les matrices contenant les surnageants neutralisés sont

similaires à celles obtenues avec les matrices contenant les surnageants natifs : pour les deux types de matrices, les résultats avec surnageants natifs et surnageants neutralisés ne forment pas deux groupes statistiques différents ($p > 0,05$) suggérant que la contribution des acides organiques est limitée.

Globalement, les matrices alg/cas contenant les surnageants de culture ont une activité antimicrobienne significativement supérieure à celle des matrices alginiques ($p = 0,003$). En présence de caséinate, la libération des actifs antimicrobiens produits par cette souche LAB3 est meilleure. Cela peut être lié à (i) des effets d'interactions entre les composants de la matrice et les molécules antimicrobiennes, et à (ii) des effets de structures de la matrice. Cependant, le mécanisme de diffusion des métabolites antimicrobiens ne peut pas être déterminé. En effet, les surnageants contiennent une grande variété de composés actifs mais aussi des résidus des molécules nutritives de milieu de culture, et chaque élément capable d'adsorber les molécules antimicrobiennes peut influencer leur diffusion et donc leur efficacité (Blom *et al.*, 1997).

L'ajout de caséinates aux matrices facilite la libération des actifs antimicrobiens de la matrice vers le milieu gélosé. Cette démonstration a été faite pour la souche LAB3 productrices de ces propres actifs antimicrobiens. Comme chaque souche de LAB produit ces propres actifs antimicrobiens, il était intéressant de faire le même travail avec les autres souches de LAB sélectionnées pour diversifier l'approche.

5.1.2.2 Comparaison des activités antimicrobiennes des matrices liquides d'alginate, de caséinate et d'alginate/caséinate incorporant des surnageants de culture de trois souches de LAB

Les surnageants de culture des souches LAB1, LAB2, LAB3 (récupérés à partir d'une culture de 24h, dans MRS_b à 30°C en conditions d'anaérobiose) ont été incorporés à 20 % (m/m) dans des matrices liquides d'alginate, de caséinate et d'alginate/caséinate. Leurs activités antimicrobiennes respectives ont été déterminées par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé vis-à-vis de trois souches de *Listeria* spp. : *Listeria innocua* LRGIA01, *innocua* ATCC 33090 et *monocytogenes* S162 (**Figure 5.8**).

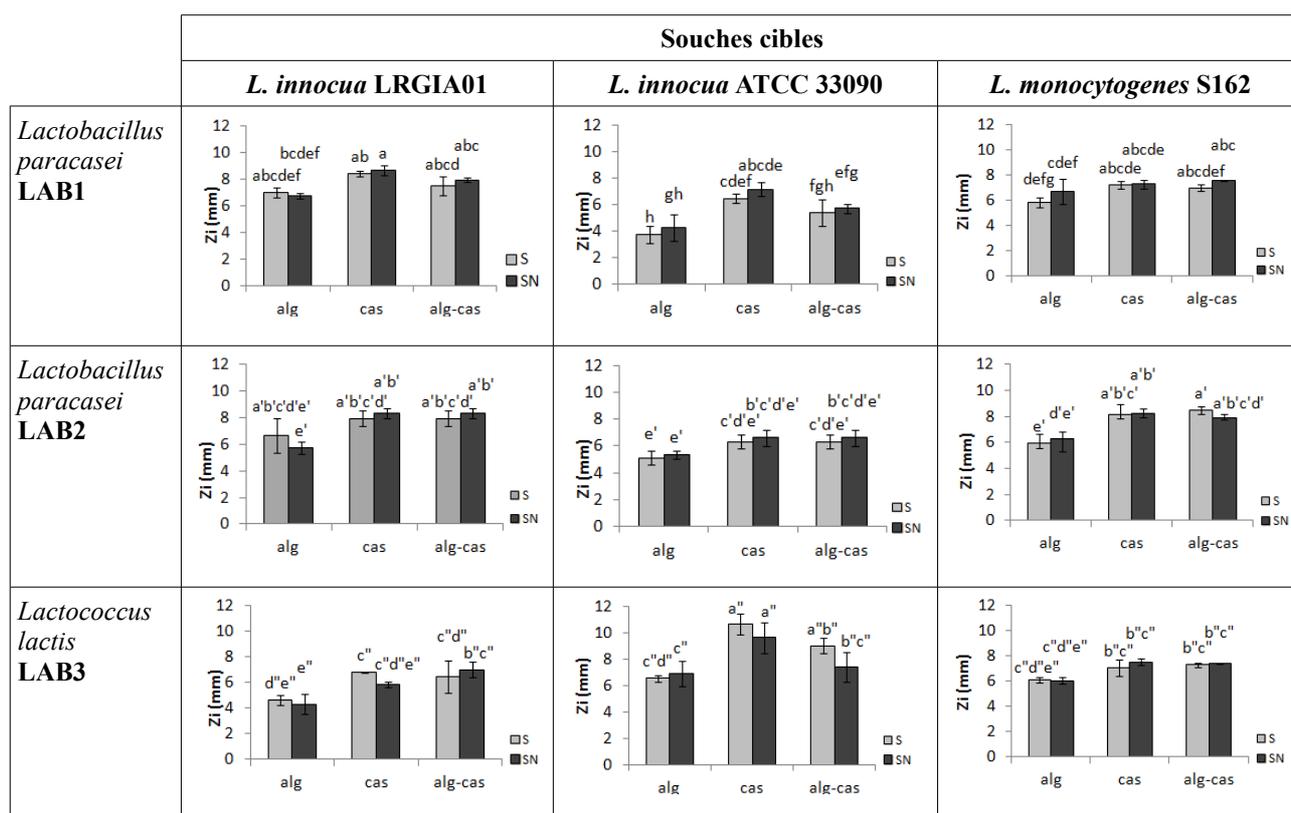


Figure 5.8 Activité anti-*Listeria innocua* LRGA01, *innocua* ATCC 33090 et *monocytogenes* S162 des surnageants de culture (neutralisés et non (SN et S)) de 3 souches de LAB incorporés à 20 % (m/m) dans les matrices polymériques par la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé (n=3).

Matrice alg : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Matrice cas : 4 % (m/m) de caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Matrice alg/cas : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 4 % (m/m) de caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Pour une même souche de LAB, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Les surnageants des trois souches de LAB incorporés dans les différents mélanges polymériques ont tous une activité contre les trois souches de *Listeria* spp. testées. Les zones d'inhibition obtenues avec ces trois souches de LAB ne forment pas trois groupes statistiques différents ($p > 0,05$). Malgré les différences de souches et donc de métabolites antimicrobiens produits, comme l'ont montré les tests thermiques et enzymatiques réalisés sur les surnageants de culture (Chapitre 3), leur activité anti-*Listeria* est semblable.

Néanmoins, la composition de la matrice influence la diffusion des agents antimicrobiens comme remarqué précédemment pour la seule souche LAB3. Dans la matrice d'alginate seul, la libération est moins importante que lorsque les mêmes surnageants sont placés en matrice alg/cas ou caséinate seule. A titre d'exemple, le surnageant de LAB3 non neutralisé en matrice alg inhibe *L.innocua* LRGA01 avec un diamètre de $4,67 \pm 0,33$ mm alors que dans la matrice alg/cas, il inhibe avec un

diamètre de $6,47 \pm 1,23$ mm. De même, ce phénomène est retrouvé pour LAB2 contre *L. innocua* LRGIA01 où le diamètre d'inhibition du surnageant non neutralisé est de $6,67 \pm 1,31$ mm dans alg et de $7,96 \pm 0,62$ mm dans alg/cas. La libération des agents antimicrobiens produits par ces LAB est donc plus favorable en présence de caséinate dans la matrice. Cela pourrait s'expliquer par les différences d'interactions mises en jeu dans un système d'alginate seul, dans un système de caséinate seule et dans un système alg/cas. Mais il reste difficile de faire une hypothèse précise puisque les agents antimicrobiens sont de natures diverses (acides organiques, peptides, peroxydes, ...) non identifiés précisément et non quantifiés.

Lors de l'incorporation de surnageant neutralisé dans les matrices, 80 % ou plus de l'activité anti-*Listeria* obtenue en comparaison avec les matrices incorporant des surnageants non neutralisés sont conservés. Comme montré précédemment, cela confirme que l'activité antimicrobienne n'est pas due uniquement à l'abaissement de pH par production d'acide(s) organique(s). De plus, les surnageants *Lactococcus lactis* LAB3 ont montré une activité antimicrobienne plus homogène en fonction des différents supports avec seulement la formation de 5 groupes statistiques différents (**Figure 5.8**).

D'après ces résultats d'incorporation des surnageants de culture dans les matrices, pour les trois souches de LAB bioprotectrices sélectionnées, les métabolites antimicrobiens produits diffusent mieux vers le milieu gélosé en présence de caséinates. Deux hypothèses avaient été énoncées pour essayer d'expliquer l'activité anti-*Listeria* plus importante des matrices alg/cas contenant les cellules de LAB. Ces matrices permettent une meilleure survie des cellules or la production d'actifs antimicrobiens pour les LAB est généralement liée à un système de QS, système dont la réponse est fonction de la densité cellulaire. La deuxième hypothèse concernant les propriétés libératrices des différentes matrices est donc à prendre en compte également. Les systèmes contenant des caséinates ont un potentiel bioprotecteur supérieur du fait à la fois du maintien de la cultivabilité des cellules de LAB bioprotectrices et d'une meilleure libération des actifs antimicrobiens des matrices vers le milieu gélosé. À ce jour, aucun article traitant de tels systèmes polymériques permettent d'étouffer ces hypothèses.

De la même façon, les expérimentations visant à évaluer le potentiel bioprotecteur des matrices contenant les cellules de LAB ont été reproduites après gélification des matrices par la méthode instantanée par ajout d'ions bivalents Ca^{2+} permettant la gélification de la phase continue

d'alginate. D'un point de vue applicatif, la gélification pourrait permettre une meilleure adaptation pour des systèmes de bioprotection dans les emballages alimentaires et pour des surfaces.

5.2 Activité antimicrobienne des matrices polymériques gélifiées, supports des actifs antimicrobiens produits ex situ et in situ

5.2.1 Activité anti-*Listeria* des surnageants de culture des souches de LAB sélectionnées incorporés dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate gélifiées, production des actifs antimicrobiens ex situ

Les surnageants de culture des souches LAB1, LAB2, LAB3 ont été incorporés dans les matrices alg et alg/cas. Celles-ci ont été gélifiées sous forme de billes en extrudant les matrices gélifiantes dans une solution de CaCl₂. Les billes formées ont un diamètre compris entre 1,5 mm et 2,0 mm. L'activité antimicrobienne des billes a été testée contre deux souches de *L. innocua* : LRGIA01 et ATCC 33090. Ces deux souches ont été choisies comme modèle pour la souche pathogène *L. monocytogenes* pour des facilités de manipulation et de plus, elles ont des sensibilités quelques peu différentes vis-à-vis des trois souches de LAB utilisées (LAB1, LAB2, LAB3).

Cette première étape a permis de vérifier si :

- (1) les actifs antimicrobiens produits par ces souches pouvaient dé-sorber des billes d'alg et d'alg/cas vers le milieu gélosé ;
- (2) les quantités ainsi libérées étaient suffisantes pour avoir une activité antimicrobienne.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 5.9**. Il est à noter que les billes d'alg ou d'alg/cas contenant seulement du milieu MRS_b stérile n'ont pas de propriétés anti-*Listeria*.

Concernant les souches LAB1 et LAB3, les diamètres des zones d'inhibition maximaux relevés sont du même ordre que ceux relevés suite à l'action des matrices liquides incorporant les surnageants de culture (entre 6 et 8 mm). Le niveau de désorption des actifs antimicrobiens permet d'avoir une activité comparable à celle obtenue avant gélification. Néanmoins, la comparaison entre ces systèmes gélifiés et les systèmes liquides (5.1.2.2) ne peut pas être faite car les quantités de surnageant déposées pour chaque méthode ne sont pas identiques (40 µL pour un dépôt dans les puits et une bille est composée de seulement environ 25 µL de mélange contenant le surnageant).

De plus, lors de la gélification, le rendement d'encapsulation des métabolites contenus dans le surnageant ne doit pas être de 100 % (mais avec ces systèmes complexes où le surnageant contient un grand nombre de composés, le rendement d'encapsulation n'a pas pu être déterminé). L'identification complète des composés antimicrobiens majoritaires produits par ces souches aurait pu permettre de mettre en place une méthode de quantification des agents qui diffusent à travers les matrices pour simplifier les comparaisons. Les substances anti-*Listeria* des surnageants de culture de LAB1 diffusent en bille d'alg/cas pour inhiber *L. innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 avec des diamètres d'inhibition égaux à $7,97 \pm 0,54$ mm et $9,70 \pm 0,50$ mm, de même pour LAB3 avec des diamètres d'inhibition de $10,67 \pm 0,26$ mm contre LRGIA01 et $6,15 \pm 0,14$ mm contre ATCC 33090.

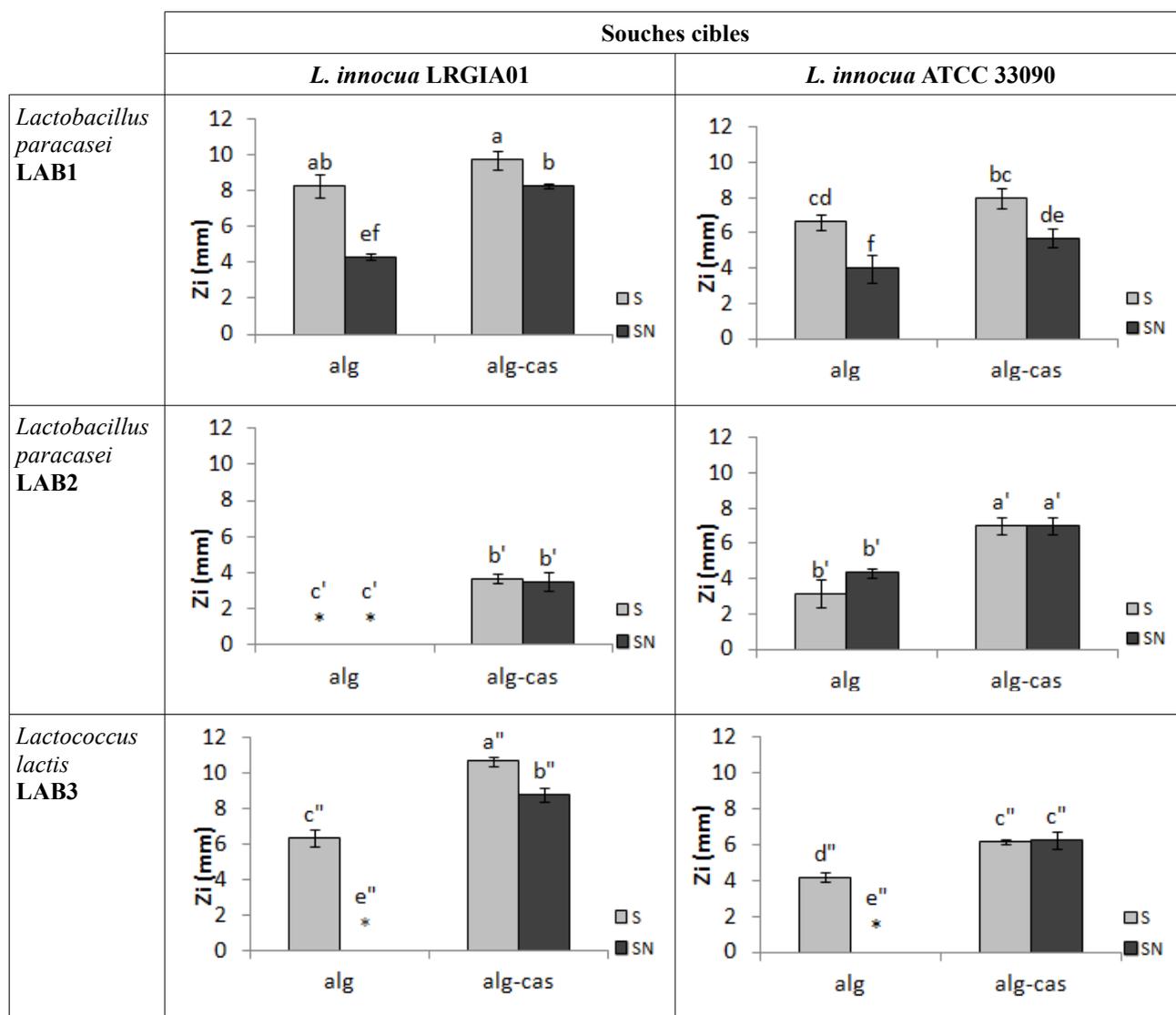


Figure 5.9 Activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 et *innocua* ATCC 33090 des surnageants de culture (neutralisé et non (SN et S)) de 3 souches de LAB incorporés à 20 % (m/m) dans les matrices polymériques par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3).

Matrice alg : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Matrice alg/cas : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 4 % (m/m) de caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Pour une même souche de LAB, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

* : aucune zone d'inhibition observée.

Les surnageants neutralisés de LAB1 donnent des zones d'inhibitions de diamètres statistiquement inférieurs aux surnageants non neutralisés. Ce phénomène pourrait refléter la part de l'action de l'effet pH. Pour la souche LAB3, ce même phénomène est observé pour les billes d'alginate. Les billes contenant du surnageant neutralisé ne montrent aucune action antimicrobienne. Les composés antimicrobiens autres que ceux impliqués dans l'effet pH ne semblent pas être libérés,

ou libérés en quantité insuffisante, pour observer une activité anti-*Listeria* en 24h. La neutralisation du surnageant modifie totalement le pH des matrices gélifiantes avant gélification. Par exemple pour le cas de la souche LAB3, le pH est égal à 4,3 pour la matrice d'alg incorporant du surnageant non neutralisé et de 6,8 pour un surnageant neutralisé. Pour la matrice alg/cas, le pH est égal à 5,3 pour la matrice incorporant du surnageant non neutralisé et de 6,6 pour un surnageant neutralisé. Cette modification de pH pourrait changer les interactions électrostatiques existantes entre composés antimicrobiens et polymères, jouant par la suite sur la désorption de ces actifs antimicrobiens après gélification. La plupart des bactériocines ont des points isoélectriques supérieurs à 8,0 comme la nisine (pI = 8,5) (Xiao *et al.*, 2011), la lacticine Z (pI = 10,4), la lacticine Q (pI = 10,6) (Iwatani *et al.*, 2007) et la lactococcine (pI = 10,9) (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). Dans notre cas, aux valeurs de pH des matrices incorporant les surnageants de culture natifs ou neutralisés, les actifs de nature peptidique s'apparentant à des bactériocines seraient chargés positivement pouvant interagir avec l'alginate chargé négativement dans cette gamme de pH. Ce phénomène pourrait expliquer le fait que les actifs antimicrobiens soient libérés plus difficilement des matrices d'alginate seul. Avec l'ajout de caséinates, cette libération pourrait être facilitée par la compétition des interactions polymère/polymère et polymère/actif antimicrobiens.

La libération des actifs antimicrobiens reste donc meilleure dans les billes d'alg/cas par rapport aux billes d'alg pour les trois souches de LAB testées, comme cela a été précédemment observé pour les matrices liquides. Dans ces systèmes gélifiés, la microstructure peut également avoir son importance sur la diffusion de molécules actives. Lee *et al.*, en 2011, ont immobilisé des cellules de levures dans des billes pour la production d'éthanol. Ils ont conclu que la taille physique des billes n'était pas le paramètre le plus important pour assurer la conversion du glucose en éthanol (entrée du nutriment et sortie du métabolite), mais, par contre, la porosité des billes était un des facteurs primordiaux. Néanmoins, il est compliqué d'établir cette taille. Lee *et al.* (2011) ont fait des observations en Microscopie Electronique à Transmission (MET) et ils se sont heurtés à un problème lors de la préparation des échantillons. Les billes se contractent pendant les étapes de préparation des échantillons, il est donc difficile d'être sûr de maintenir la morphologie initiale pour les observations. De même, Stoppel *et al.*, en 2011, ont étudié la diffusion d'une grosse molécule (BSA, ~67000 g.mol⁻¹) et d'une petite molécule (Riboflavin ou vitamine B2, ~380 g.mol⁻¹) à travers un réseau d'alginate. Le facteur, qui influe le plus sur le transport de ces molécules, est la structure interne du gel, c'est-à-dire les variations au niveau du maillage. Par exemple, la diffusion est plus importante dans des gels homogènes (vérifié surtout avec la protéine). Les analyses en microscopie

électronique à balayage nous ont permis d'étudier les microstructures de nos billes d'alg et d'alg/cas. Des microdomaines de protéines ont été identifiés dans le réseau d'alginate dans le cas des billes d'alg/cas. Ces zones font que le gel est moins dense et cela pourrait faciliter la libération des actifs antimicrobiens.

Globalement, les billes contenant les surnageants de la souche LAB1 sont les plus actives d'un point de vue de l'activité antimicrobienne (*groupe statistique α*), puis ce sont les billes contenant les surnageants de la souche LAB3 (*groupe statistique $\alpha\beta$*) puis celles contenant les surnageants de la souche LAB2 (*groupe statistique β*). Les métabolites produits par ces trois souches sélectionnées précédemment LAB1, LAB2, LAB3 diffusent donc en quantité suffisante, des matrices d'alg et d'alg/cas gélifiées vers le milieu extérieur contenant la souche cible, pour avoir des activités antimicrobiennes significatives. De la même façon que pour les mélanges liquides, les cellules des trois souches de LAB ont été immobilisées dans ces mêmes mélanges gélifiés pour s'intéresser à la cultivabilité des cellules au cours du temps et à l'activité antimicrobienne de telles matrices.

5.2.2 Évaluation de l'effet des cultures des souches de LAB sélectionnées dans les matrices d'alginate et d'alginate/caséinate gélifiées sur le développement de *Listeria innocua*, production des actifs antimicrobiens in situ

5.2.2.1 Gélification sous forme de billes

5.2.2.1.1 Confinement des cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 : suivi de la cultivabilité et de l'activité anti-*Listeria*

L'immobilisation a été réalisée en gélifiant les matrices d'alg et d'alg/cas liquides chargées à 10^8 (C1) et 10^4 UFC.mL⁻¹ (C2) avec les cellules de la souche *Lactococcus lactis* LAB3. Le nombre de cellules par bille obtenu est de 10^{6-7} UFC/bille en partant du liquide chargé à C1 et de 10^{2-3} UFC/bille en partant du liquide chargé à C2. L'homogénéité de la répartition des cellules sur l'ensemble des billes a été testée. Sur un échantillon de 20 billes à J0 (c'est-à-dire juste après l'incorporation et la gélification des billes), la population bactérienne s'est répartie de façon homogène avec un écart type de 0,1 logN (UFC/bille), une moyenne à $10^{6.7}$ UFC/bille, une valeur minimale de $10^{6.4}$ UFC/bille et une valeur maximale de $10^{6.8}$ UFC/bille. De même, sur 48h,

l'évolution de la population bactérienne est restée homogène entre une vingtaine de billes avec un écart-type de 0,1 logN (UFC/bille), une moyenne à $10^{6,3}$ UFC/bille, une valeur minimale de $10^{6,1}$ UFC/bille et une valeur maximale de $10^{6,5}$ UFC/bille.

Ces billes immobilisant les cellules de *Lactococcus lactis* LAB3 ont été stockées à 30°C pendant 12 jours. Elles ont été testées pour leurs activités anti-*Listeria innocua* LRGIA01 et la cultivabilité des cellules de LAB3 a été suivie à intervalle régulier (**Figure 5.10**).

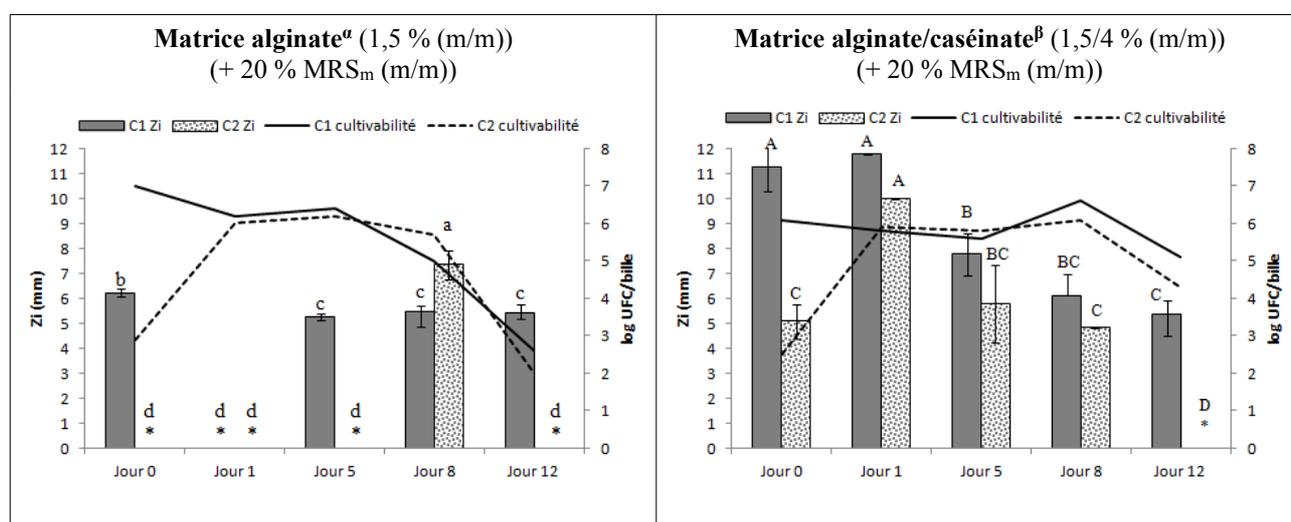


Figure 5.10 Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactococcus lactis* LAB3 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.

α , β : Les résultats obtenus dans les matrices alginate et alginate/caséinate forment deux groupes statistiquement différents d'après le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Pour une même composition de matrice, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

C1, charge initiale en cellules de LAB3 dans les matrices gélifiantes de 10^8 UFC.mL⁻¹ ; C2, charge initiale en cellules de LAB3 dans les matrices gélifiantes de 10^4 UFC.mL⁻¹.

* : aucune zone d'inhibition observée.

Le suivi de la cultivabilité des cellules de LAB3 dans les billes a permis de montrer que LAB3 survivait dans les matrices alg/cas de façon plus importante que dans les matrices d'alg seul. A J12, les cellules de LAB3 sont encore 10^{4-5} UFC/bille dans les billes d'alg/cas alors qu'elles ne sont plus que 10^{2-3} UFC/bille dans les billes d'alg. Avec la charge initiale C2, une multiplication de LAB3 a été observée pendant les 24 premières heures de stockage à 30°C pour rejoindre la population

présente dans les billes initialement chargées à C1, puis le nombre de cellules se maintient de façon similaire à ce qu'il se passe dans les billes initialement chargées à C1.

Ces résultats sur 12 jours à 30°C seraient conformes à ceux observés par Bevilacqua *et al.* (2010) dans des gels d'alginate pour des cellules de *Lactobacillus plantarum*. Ils ont chargé à 10^9 UFC.g⁻¹ de cellules de *Lactobacillus plantarum* dans leur gel et après 12 jours à 30°C, il en reste 10^5 UFC.g⁻¹.

L'alginate de sodium permet donc d'immobiliser des cellules de LAB de façon efficace comme l'ont montré de nombreuses équipes et notamment Brachkova *et al.* (2010). Ces derniers ont chargé des billes d'alginate (contenant du MRS_b) avec des cultures de lactobacilles à 10^8 UFC.mL⁻¹ et ont conservé cette viabilité stable sur 6 mois à 4°C en lyophilisant la préparation.

Dans notre cas, la meilleure cultivabilité obtenue dans les billes d'alg/cas pourrait être due essentiellement à l'apport nutritif des caséinates. Néanmoins, des effets de microstructures pourraient également jouer un rôle. La répartition des cellules de LAB3 dans les billes d'alg/cas n'est pas aléatoire contrairement aux billes d'alg. Les cellules sont regroupées principalement dans les microdomaines protéiques. Cette localisation préférentielle fait que la concentration cellulaire n'est pas homogène au sein de la bille et la communication entre cellules peut se trouver facilitée augmentant leur niveau de survie. De plus, Lopez-Rubio *et al.*, en 2012, ont montré que la différence de perméabilité à l'oxygène entre des capsules à base de pullulane et celles à base de lactosérum pourrait jouer un rôle sur la survie de souches de *Bifidobacterium* qui sont des souches sensibles à la présence d'oxygène pendant leur croissance. Cette survie est augmentée dans les capsules protéiques par rapport aux capsules polysidiques.

Cependant, l'ajout de protéine à un polyside (comme l'alginate) ne donne pas toujours le même effet selon la littérature. Millette *et al.*, en 2004, ont immobilisé des cellules de la souche *Lactococcus lactis* ATCC 11454 dans des billes d'alginate de calcium/lactosérum. Ils ont montré, par dénombrement sur milieu gélosé des cellules de LAB après dissolution des billes, que la population bactérienne à l'intérieur des billes d'alginate/lactosérum (1,5 % (m/v) / 1 % (m/v)) ($5,44 \pm 0,06$ log UFC/bille) était significativement inférieure à celle à l'intérieur des billes d'alg uniquement (1,5 % (m/v)) ($5,85 \pm 0,06$ log UFC/bille).

En parallèle du suivi de la cultivabilité, l'activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 des billes ont été testées au même temps J0, 1, 2, 5, 8 et 12 (**Figure 5.10**). Les matrices alg et alg/cas gélifiées ont montré une activité anti-*Listeria* sachant que les billes sans cellules de LAB ne sont pas actives.

La lecture des boîtes test a été réalisée après 24h d'incubation de *Listeria innocua* LRGIA01.

Pour les mêmes charges initiales (C1 ou C2), les diamètres des zones d'inhibition des matrices d'alginate seul sont beaucoup plus faibles et moins réguliers que ceux obtenus dans les matrices d'alg/cas. Les résultats pour ces deux types de formulation forment globalement deux groupes statistiquement différents ($p < 0,05$), comme cela a été observé pour le cas des matrices liquides. La composition de la matrice joue un rôle important dans la libération des agents antimicrobiens. Cela avait déjà été remarqué dans le cas des matrices liquides avec surnageant et cellules et pour les billes contenant du surnageant. L'apport de caséinate semble favoriser :

- (1) la libération des actifs antimicrobiens ;
- (2) la survie des cellules de LAB.

Il est intéressant de remarquer que pour la charge C1, l'effet inhibiteur est présent dès l'incorporation des cellules dans le mélange (J0) et pour la charge C2, cet effet est différé de 24h pour les billes d'alginate et est beaucoup moins important dans les billes alg/cas par rapport à la charge C1 dans le même cas. Pour la charge C2, le métabolisme mis en œuvre les premières 24h semble essentiellement servir à la multiplication de la population et diffère alors la production d'antimicrobiens. Ce phénomène a également été observé pour les matrices liquides. D'un point de vue applicatif, cela peut être un point important du choix de la charge en fonction du moment où l'effet inhibiteur est désiré. Si une activité antimicrobienne est recherchée immédiatement, la charge C1 s'imposerait, si l'on souhaite une activité différée, la charge C2 serait suffisante. La densité cellulaire semble donc jouer un rôle important dans la production d'agent antimicrobien pour cette souche LAB3. Brachkova *et al.* (2010) ont également fait cette remarque en envisageant de concentrer encore davantage les cellules immobilisées pour optimiser la viabilité et les activités antimicrobiennes.

L'encapsulation ne détruit pas le potentiel antimicrobien des cellules de LAB3. Une activité antimicrobienne d'un dépôt équivalent à $4 \cdot 10^6$ UFC de cellules de LAB3 (dépôt de 40 μ L de matrice liquide à 10^8 UFC.mL⁻¹ de cellules de LAB3) contre *L.innocua* LRGIA01 a été déterminée à $19,14 \pm 0,93$ mm. Malgré l'immobilisation, une zone, certes deux fois plus petite, est atteinte avec le dépôt d'une bille d'alg/cas contenant environ 10^6 UFC. Brachkova *et al.* (2010) ont fait un constat similaire pour leur souche de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIP 53.61 immobilisée dans des billes d'alginate. En effet, une inhibition d'*Enterococcus faecalis* a été observée avec 10^9 UFC dans le cas de cellules immobilisées alors que cette activité était détectable dès 10^7 UFC dans le cas de cellules libres (Brachkova *et al.*, 2010). D'un autre côté, Ivanova *et al.* (2002) ont immobilisé une

souche d'*Enterococcus faecium* dans une matrice d'alginate de calcium et les cellules immobilisées ont été plus efficaces dans la production de leur bactériocine par rapport à des cellules libres. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que l'immobilisation provoque chez les cellules un état de stress pouvant conduire à des mécanismes de résistance et de défense comme la production de molécules antimicrobiennes (Bevilacqua *et al.*, 2010).

Ces résultats sur la cultivabilité et l'activité antimicrobienne des cellules de la souche *Lactococcus lactis* LAB3 se sont montrés probants et il a été pertinent de diversifier l'approche en utilisant deux autres souches de LAB.

5.2.2.1.2 Confinement des cellules de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 : suivi de la cultivabilité et de l'activité anti-*Listeria*

Les deux taux d'inoculation initiaux qui ont été testés pour ces deux souches sont les suivants :

- C1 : 10^{10} UFC.mL⁻¹ pour LAB1 et 10^9 UFC.mL⁻¹ pour LAB2 ;
- C2 : 10^5 UFC.mL⁻¹ pour les deux souches.

Ces concentrations cellulaires correspondent aux concentrations dans les matrices liquides à gélifier. Ces matrices ont par la suite été gélifiées sous forme de billes de 1,5 à 2 mm de diamètre par extrusion dans une solution de CaCl₂. Les populations bactériennes de LAB1 et LAB2 ont été suivies pendant 12 jours avec un stockage à 30°C et les activités antimicrobiennes des billes d'alg et d'alg/cas incorporant les cellules de LAB ont été mesurées contre deux souches de *L. innocua* : *innocua* LRGIA01 et *innocua* ATCC 33090 (**Figure 5.11** et **Figure 5.12**).

5.2.2.1.2.1 Cultivabilité

Les tendances observées pour la survie des cellules dans les matrices gélifiées semblent être proches de celles précédemment mises en évidence dans le cas des matrices liquides. Pour la charge microbienne C1, la cultivabilité se maintient au-dessus de 10^{5-6} UFC/bille jusqu'au 8^{ème} jour. La survie des cellules est plus contrariée dans les billes d'alginate seul par rapport aux résultats obtenus pour les matrices liquides. Pour une charge initiale C2 (10^3 UFC/bille), la population de LAB1 augmente jusqu'à 10^6 UFC/bille dans la matrice alg/cas et se maintient à 10^{5-6} UFC/bille tandis qu'en bille d'alginate seul, elle diminue entre J1 et J5 jusqu'à 10^{3-4} UFC/bille et s'y maintient. Cela montre qu'à faible charge initiale, la population ne se maintient pas avec le polyoside seul. De la

même façon qu'en milieu liquide, la population correspondant à la plus faible charge (C2) se développe sur les 24 premières heures pour rattraper celle de l'inoculum C1.

L'apport des caséinates s'avère donc également bénéfique pour la survie des cellules de LAB1 et LAB2 dans les billes.

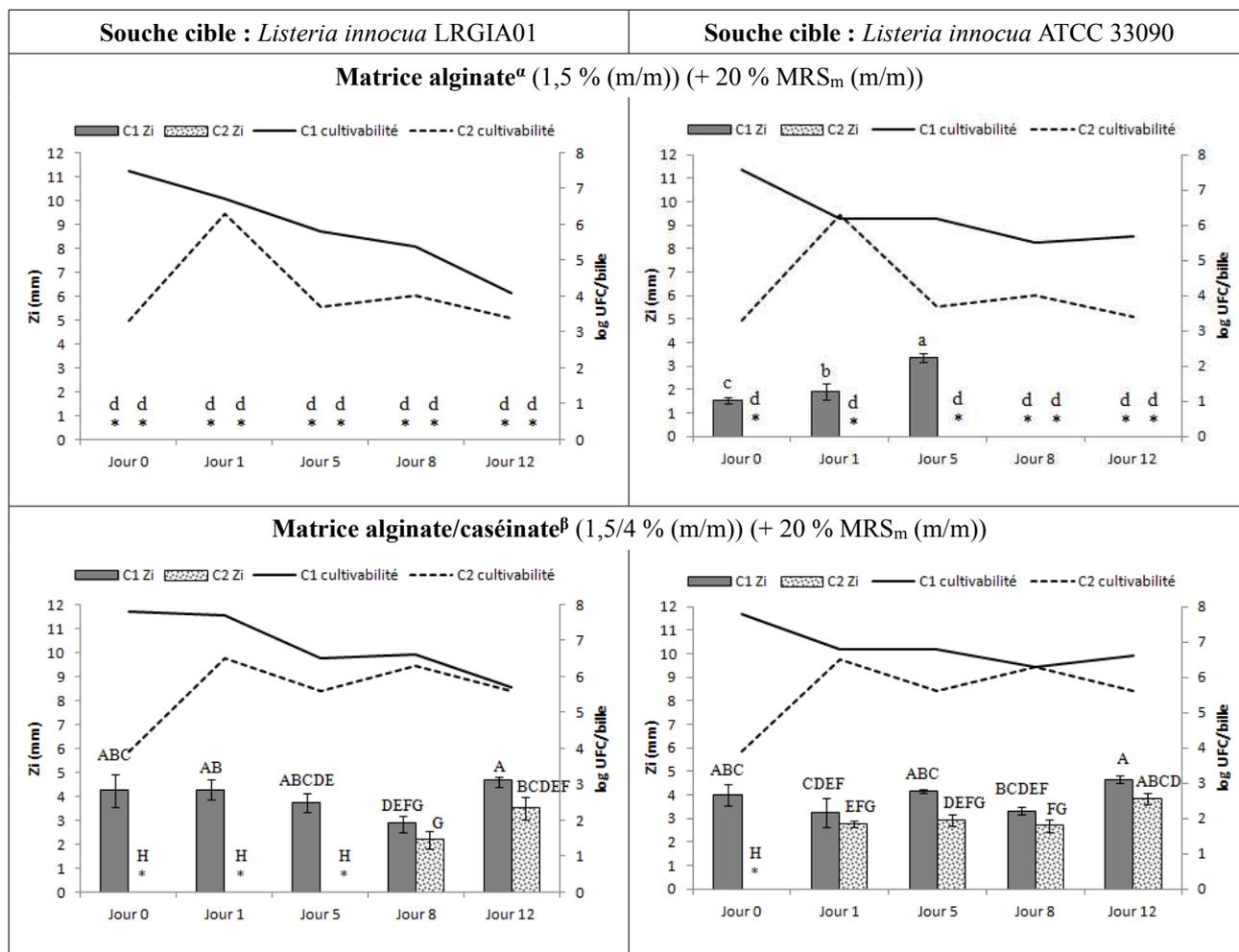


Figure 5.11 Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB1 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.

α , β : Les résultats obtenus dans les matrices alginate et alginate/caséinate forment deux groupes statistiquement différents d'après le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Pour une même composition de matrice, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

C1, charge initiale en cellules de LAB1 dans les matrices gélifiantes de 10^{10} UFC.mL⁻¹ ; C2, charge initiale en cellules de LAB1 dans les matrices gélifiantes de 10^5 UFC.mL⁻¹.

* : aucune zone d'inhibition observée.

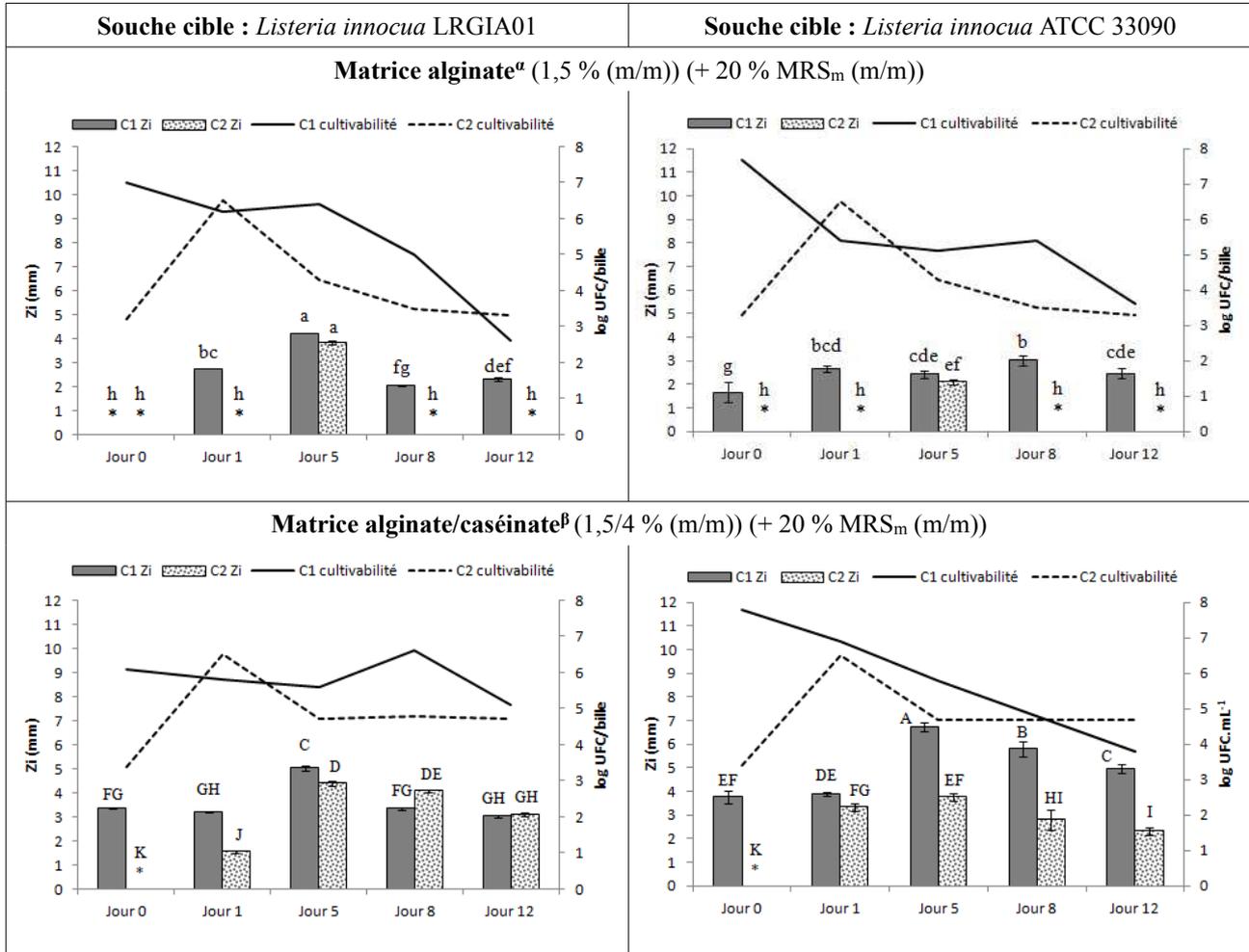


Figure 5.12 Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactobacillus paracasei* LAB2 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) stockées à 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGA01 et ATCC 33090 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24 h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.

α , β : Les résultats obtenus dans les matrices alginate et alginate/caséinate forment deux groupes statistiquement différents d'après le test statistique Anova ($p < 0,05$).

Pour une même composition de matrice, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

C1, charge initiale en cellules de LAB1 dans les matrices gélifiées de 10^9 UFC.mL⁻¹ ; C2, charge initiale en cellules de LAB1 dans les matrices gélifiées de 10^5 UFC.mL⁻¹.

* : aucune zone d'inhibition observée.

5.2.2.1.2.2 Activité anti-*Listeria*

Le test anti-*Listeria* LRGIA01 pour les billes contenant la souche LAB1 (**Figure 5.11**) avec une charge initiale maintenue à 10^6 UFC/bille, montre que dès J0 une zone d'inhibition de $4,23 \pm 0,54$ mm est observable dans la matrice alg/cas. Cette inhibition s'est maintenue avec la même intensité au cours des 12 jours. Pour les billes à base d'alginate seul, aucune zone d'inhibition n'a été détectée sachant que l'ensemble des résultats présentés sur la **Figure 5.11** a été mesuré après 24h d'incubation des boîtes test pour le développement de *Listeria*. Par ailleurs, le test anti-*Listeria innocua* LRGIA01 avec des billes contenant LAB2 montre un effet inhibiteur dans la matrice alg/cas moins important que pour LAB1. Le diamètre correspondant est de $3,36 \pm 0,44$ mm à J0 ; celui-ci a augmenté à $5,02 \pm 0,44$ mm à J5, puis a diminué à $3,03 \pm 0,18$ mm à J12. L'inhibition en milieu gélifié alg/cas de *Listeria innocua* LRGIA01 par les cellules de LAB1 est plus importante que celle de LAB2 comme observé pour les matrices non gélifiées.

Les billes d'alg ont une activité antimicrobienne nettement plus faible que celle d'alg/cas. Les résultats avec alg et alg/cas forment, pour les deux souches, deux groupes statistiquement différents ($p < 0,05$). Ce comportement différent des matrices alg et alg/cas a ainsi été mis en évidence sur l'ensemble des résultats : matrices liquides avec surnageants et cellules, billes avec surnageants et cellules et ce pour les trois souches de LAB étudiées.

L'activité inhibitrice de LAB2 vis-à-vis de *Listeria* LRGIA01 est plus importante que LAB1 dans les billes d'alginate seul. Précédemment, les métabolites antimicrobiens mis en évidence pour LAB1 et LAB2 ne semblaient pas avoir exactement les mêmes caractéristiques (Chapitre 3). Ils peuvent différer de part leur poids moléculaires, leur charge, leur efficacité, leur quantité. Les métabolites antimicrobiens produits par LAB2 auraient donc des cinétiques de diffusion dans les billes d'alginate plus rapides que celles des métabolites produits par LAB1. La capacité antimicrobienne des billes encapsulant les cellules de LAB1 dépend donc de la formulation des matrices gélifiantes. L'apport de caséinate dans le milieu de culture favorise l'inhibition de *L. innocua* LRGIA01, d'une part en favorisant la survie des cellules et d'autre part en favorisant la libération des actifs antimicrobiens. Il se pourrait qu'il y ait des interactions entre les agents antimicrobiens produits par LAB1 et l'alginate, ce qui diminuerait leur libération des billes d'alginate uniquement.

Pour le test anti-*Listeria innocua* LRGIA01 des billes avec les cellules de LAB chargées initialement à C2, l'activité antimicrobienne, si elle est présente, est généralement différée d'au moins 24h. On peut remarquer qu'au cours de la multiplication cellulaire, l'activité inhibitrice de LAB1 vis-à-vis de *Listeria innocua* LRGIA01 est très faible voire inexistante comme

précédemment relevé pour le cas de LAB3 et des matrices liquides.

Le test anti-*Listeria innocua* ATCC 33090 dans la matrice alg/cas montre une inhibition qui a augmenté jusqu'à $7,70 \pm 0,33$ mm pour LAB1 (avec une charge initiale C1) et à $6,80 \pm 0,20$ mm pour LAB2 puis ces zones ont diminué jusqu'à J12 avec un diamètre de $3,00 \pm 0,12$ mm pour LAB1 et de $4,90 \pm 0,17$ mm pour LAB2 (**Figures 5.11 et 5.12**). Pour LAB2, après 24h d'incubation à 30°C des boîtes test, les zones d'inhibition sont stables durant 12 jours entre 2 et 3 mm. Avec une charge initiale C2, l'inhibition de *Listeria innocua* ATCC 33090 des billes alg/cas est nulle à J0. Après au moins 24h et la multiplication cellulaire, les billes alg/cas chargées initialement à C2 montrent une activité antimicrobienne. Ces résultats confirmeraient la régulation de la production d'actifs antimicrobiens par un mécanisme de QS. Pour ces trois souches (LAB1, LAB2, LAB3), à la fois en milieu liquide et en milieu gélifié, la production de métabolites antimicrobiens est à corrélérer à la densité cellulaire. En effet, dans le cas d'un mécanisme de type QS, les bactéries lactiques sont conscientes de la densité cellulaire lorsque la concentration de la molécule de signalment atteint un seuil critique, alors le comportement de la population est modifiée (Boyen *et al.*, 2009).

Les activités antimicrobiennes discutées précédemment reposent sur les relevés des zones d'inhibition après 24h de développement des souches de *Listeria*. Ces zones d'inhibition ont également été mesurées après un temps plus long d'incubation pour mieux prendre en compte la cinétique de libération des actifs antimicrobiens.

5.2.2.1.2.3 Libération des actifs antimicrobiens en fonction du temps

Lors du test antimicrobien, les billes sont déposées entre deux couches de gélose. Il peut donc se produire des échanges d'eau par exemple entre la gélose et la bille, modifiant la structure de la bille, pouvant favoriser la libération au cours du temps de certains actifs antimicrobiens. Après un suivi des boîtes test dans le temps lors de l'incubation à 30°C pour le développement de *Listeria*, des augmentations de diamètre de la zone d'inhibition pouvant atteindre 4 mm en 120h ont été mises en évidence (**Figure 5.13**). Néanmoins l'ampleur de ces augmentations dépend du jour du test, du type de la matrice et de la souche cible allant de + 1 mm à + 4 mm en 120h. Par contre dans la matrice d'alginate seul, il n'y a pas de zone à J0 avec une lecture à 24h, par contre celle-ci est apparue après 48h d'incubation à 30°C des boîtes test.

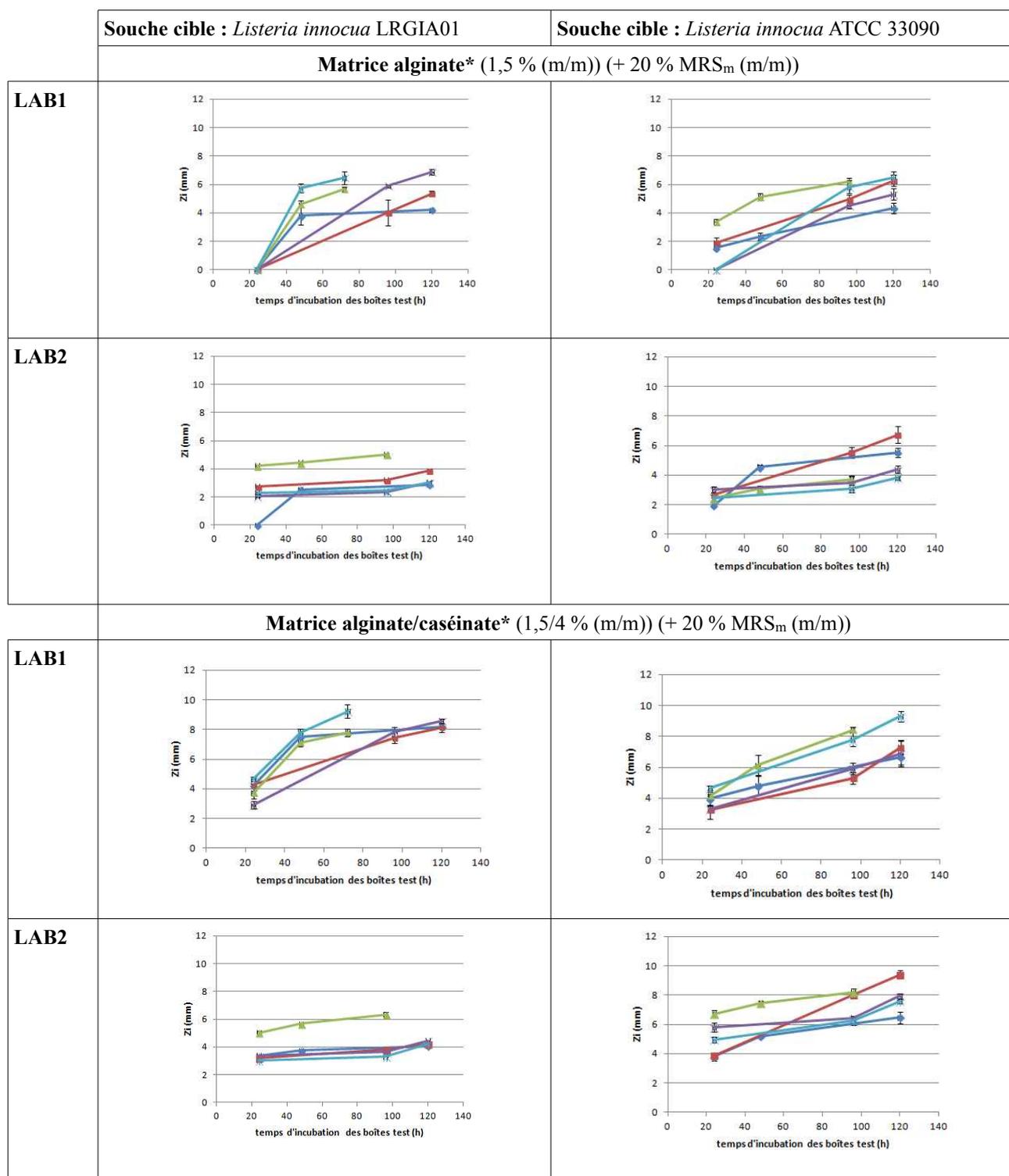


Figure 5.13 Libération des actifs antimicrobiens des matrices polymériques gélifiées (sous forme de billes) (chargée initialement avec C1) contenant des cellules de *Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2 vers la gélose : mesure des diamètres des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation des boîtes test vis-à-vis de deux souches de *Listeria innocua* (n=3).

◆ C1j0 ■ C1j1 ▲ C1j5 ✖ C1j8 ✧ C1j12

Ces courbes permettent de montrer une libération des actifs sur au moins 120h. Les profils ont été similaires à partir du J1 pour les billes chargées initialement à C2 (résultats non montrés). D'un point de vue applicatif, ces informations sont intéressantes montrant la possibilité d'une activité antimicrobienne sur plusieurs heures.

En effet, la structure d'une bille est amenée à évoluer en fonction des conditions environnementales. Wright *et al.* (2009) se sont par exemple intéressés à ces variations de microstructures pour des billes d'alginate dans des conditions environnementales gastriques et intestinales. Dans les conditions gastriques, pH = 2, les billes se rétractent car la force électrostatique répulsive entre les chaînes d'alginate diminue du fait de la protonation des groupements carboxyles. De plus, à pH faible, les ions calcium liés avec les chaînes d'alginate se dissocient et sont remplacés par des ions hydrogènes, permettant aux chaînes de se rapprocher d'où la formation d'un « gel acide ». Dans les conditions intestinales, pH = 8, les billes gonflent car la force électrostatique répulsive augmente avec le pH qui est largement au-dessus du pKa des groupements acides uroniques de l'alginate (aux alentours de 3,5). Ces changements s'opèrent au centre des billes mais affectent moins la périphérie. Dans notre cas, les valeurs de pH dans les billes seraient proches de 4,0-5,0 d'après les données concernant les matrices liquides, et le milieu gélosé en contact a un pH initial de 7,3. Au cours de l'incubation des boîtes test, les valeurs de pH vont avoir tendance à s'équilibrer entre les billes et le milieu gélosé s'éloignant du pKa des groupements acides uroniques de l'alginate. La bille gonflerait permettant la libération des actifs antimicrobiens plus facilement.

L'encapsulation des LAB bioprotectrices sous forme de billes est une forme d'immobilisation qui permet de conserver leur cultivabilité et leur viabilité. Cela a été démontré pour trois souches de LAB. Dans un objectif d'application en emballage ou en protection de surface de travail, un second support a également été testé : le gel plan.

5.2.2.2 Gélification sous forme de gels plans : confinement des cellules de Lactococcus lactis LAB3 : suivi de la cultivabilité et de l'activité anti-Listeria

Des gels plans (dimension 10x10 cm, épaisseur d'environ 2 mm) d'alg et d'alg/cas incorporant des cellules bioprotectrices de LAB3 à une concentration initiale de 10^{9-8} UFC.mm⁻² (C1) de gel ont été réalisés par gélification au contact d'un papier absorbant imbibé d'une solution de CaCl₂. La conservation s'est faite à deux températures 4 et 30°C. La température de 4°C a été

choisie, pour d'un point de vue applicatif, se placer à la température de réfrigération dans le cas de la conservation de produits alimentaires.

Des disques de gel ont été prélevés régulièrement sur les 12 jours pour suivre la cultivabilité des cellules de LAB3 (1 disque de 6 mm de diamètre) et l'activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 des gels par le test de diffusion sur milieu gélosé (3 disques de 8 mm de diamètre). Un exemple de boîte de Pétri test pour l'activité antimicrobienne est présentée **Figure 5.14**.

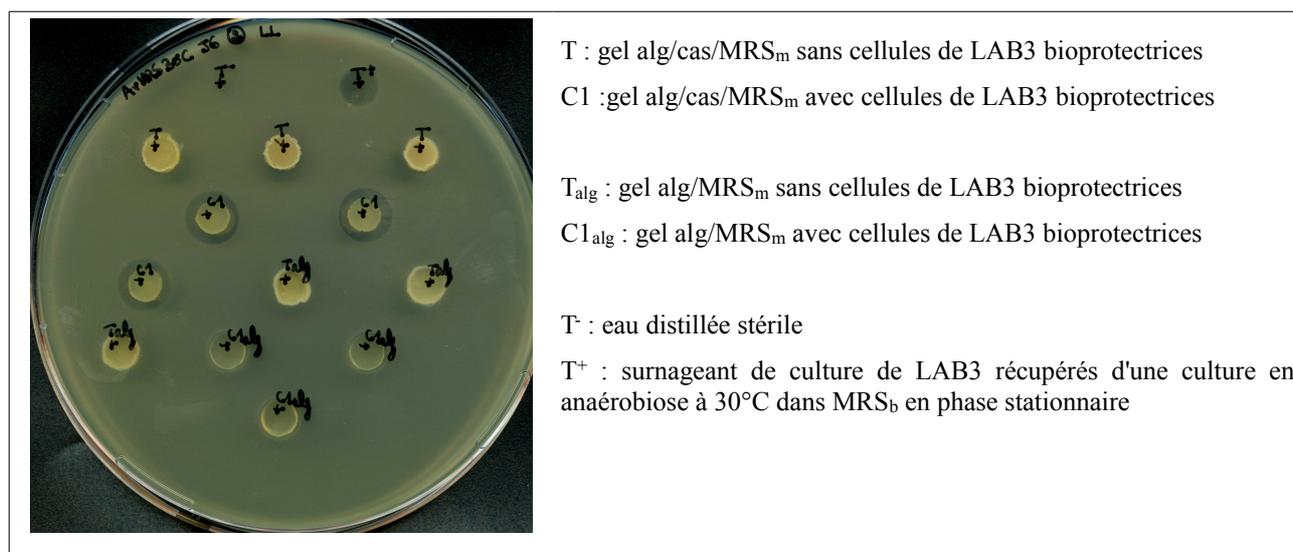


Figure 5.14 Boîte test de l'activité anti-*Listeria innocua* LRGIA01 en milieu gélosé des gels plans d'alg et d'alg/cas incorporant des cellules bioprotectrices de LAB3, 6 jours après leur incorporation, stockage à 30°C.

Gel alginate/MRS_m : 1,5 % (m/m) / 20 % MRS_m (m/m).

Gel alginate/caséinate/ MRS_m : 1,5 % (m/m) / 4 % (m/m) / 20 % MRS_m (m/m).

Les zones d'inhibition sur cette boîte test sont clairement visibles autour des disques de gel de l'échantillon noté C1 de composition alg/cas/MRS_m avec les cellules bioprotectrices LAB3. Les gels témoins sans cellules de LAB3 n'ont aucune capacité d'inhibition. Les résultats globaux sont présentés **Figure 5.15**.

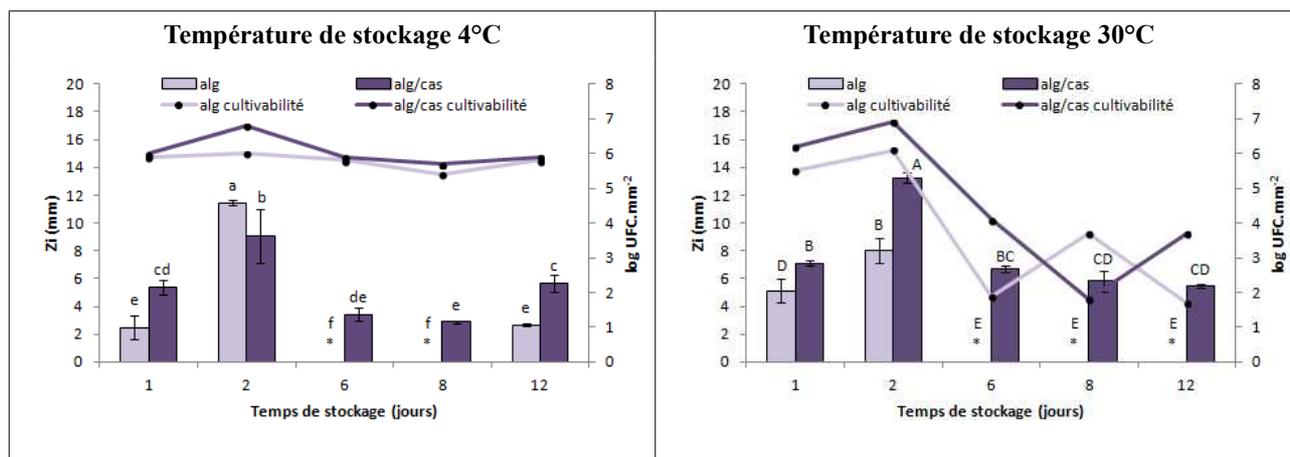


Figure 5.15 Zones d'inhibition (Zi (mm)) et survie des cellules *Lactococcus lactis* LAB3 incorporées dans les matrices polymériques gélifiées (sous forme de gels plans) stockées à 4 ou 30°C pendant 12 jours contre *Listeria innocua* LRGIA01 mesurées, respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=3) (lecture des boîtes test après 24 h) et par un dénombrement sur milieu gélosé.

Matrice alg : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Matrice alg/cas : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium + 4 % (m/m) de caséinate de sodium + 20 % (m/m) MRS_b.

Sur chaque graphique, chaque lettre indique un groupe statistique homogène selon le test statistique Anova ($p < 0,05$).

* : aucune zone d'inhibition observée.

A 4°C, la population de LAB3 se maintient entre 10^7 et 10^5 UFC.mm⁻² de gel jusqu'à 12 jours. A 30°C, une perte importante de la population est visible entre J2 et J5 de 3 logN (UFC.mm⁻²) dans les gels d'alg/cas et de 4 logN (UFC.mm⁻²) dans les gels d'alg. Bevilacqua *et al.*, en 2010, ont étudié la survie d'une population de *Lactobacillus plantarum* dans un gel d'alginate avec une charge initiale de 10^{8-7} UFC.mL⁻¹. A 30°C, la population était stable pendant 8 jours avant de chuter à 10^1 UFC.mL⁻¹ après plus de 15 jours.

Dans notre cas, à 30°C, l'évolution de la population est plus chaotique qu'à 4°C. Gialamas *et al.* (2010) ont observé la même tendance lors de l'incorporation de cellules de *Lactobacillus sakei* dans un film de caséinate de sodium à 4 et 25°C. Ils expliquent la meilleure viabilité à 4°C par la réduction du métabolisme bactérien aux basses températures.

Contrairement à ce qu'il a été observé dans les matrices liquides et dans les billes, la survie des cellules de LAB3 est similaire entre les gels d'alg et d'alg/cas. Néanmoins, l'activité antimicrobienne est toujours plus favorable en présence de caséinate ($p < 0,05$). A 4°C et à 30°C, les mêmes tendances sont observées, les résultats ne formant qu'un seul groupe statistique ($p = 0,413$). Les gels d'alg ont une activité antimicrobienne sur les 48 premières heures (excepté à J12 à 4°C) alors que les gels d'alg/cas ont une activité plus régulière sur les 12 jours. Les résultats d'activité

antimicrobienne des gels d'alg et d'alg/cas forment deux groupes statistiques différents ($p < 0,05$) comme précédemment observé pour les matrices liquides et gélifiées sous forme de billes.

5.3 Conclusion

Ce chapitre de thèse a été consacré à l'évaluation de l'activité antimicrobienne des matrices polymériques (alginate et alginate/caséinates) liquides et gélifiées incorporant des actifs antimicrobiens produits *ex situ* (surnageant de culture) et *in situ* (cellules bactériennes).

Les trois souches de LAB sélectionnées auparavant pour leur activité anti-*Listeria* (*Lactobacillus paracasei* LAB1 et LAB2, *Lactococcus lactis* LAB3) conservent ce potentiel bioprotecteur lorsque les cellules sont incorporées dans les matrices alginate ou alginate/caséinate liquide et gélifiées. Néanmoins, les matrices alg/cas sont plus actives que les matrices d'alginate seul. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce phénomène :

- (i), une meilleure survie des cellules en présence de caséinate : environ 1 log UFC.mL⁻¹ ou UFC/bille ;
- (ii), une meilleure production d'actifs antimicrobiens ;
- (iii), une meilleure libération des composés antimicrobiens de la matrice vers le milieu gélifié.

Deux de ces facteurs ont été démontrés : (i) et (iii). Cette meilleure survie pourrait s'expliquer par un apport supplémentaire de nutriments par les caséinates pour les cellules de LAB. La déstructuration des matrices liquides contenant des cellules de LAB3 observée entre le J5 et J8 pourrait être un indice du métabolisme des caséinates par les cellules de LAB3. La structure comporte initialement des gouttelettes de protéine dans une phase continue d'alginate. Au jour 8, les gouttelettes de caséinates deviennent irrégulières et consommées comme si les cellules de LAB3 les avaient consommées. Pour les souches de *Lactobacillus paracasei*, la microstructure de la matrice reste intacte, ce qui ne donne pas d'indice quant à une possible utilisation des caséinates dans leur métabolisme.

De plus, les caséinates tamponnent le pH des matrices à 5,0 en comparaison aux matrices d'alg seul à pH = 4,0. Ce phénomène pourrait réduire le stress acide des cellules de LAB favorisant ainsi une meilleure survie.

La meilleure capacité de libération des composés antimicrobiens des matrices d'alg/cas pourrait être due à des effets d'interactions entre composants de la matrice et les molécules antimicrobiennes

(interactions électrostatiques entre l'alginate anionique et les peptides antimicrobiens généralement cationiques aux valeurs de pH rencontrées) ou à des effets de structures de la matrice. En effet, comme montré au chapitre 4, les réseaux des matrices d'alg et d'alg/cas sont différents notamment dans le cas des matrices gélifiées. Néanmoins, il est difficile de conclure : d'une part, du fait de la diversité des mécanismes antimicrobiens développés par les cellules de LAB et d'autre part, du fait que les composés peptidiques antimicrobiens produits par les souches de LAB n'ont pas pu être identifiés complètement lors de cette étude.

Le facteur (ii : une meilleure production d'actifs antimicrobiens) n'a pas pu être démontré car il a été difficile de quantifier les actifs antimicrobiens produits puisque probablement plusieurs molécules de différentes natures sont produites simultanément. Néanmoins, l'activité antimicrobienne est liée à la densité cellulaire. Il faut une population en cellules suffisamment importante pour obtenir une activité antimicrobienne significative. Cela confirmerait la régulation de la production d'actifs antimicrobiens par un mécanisme de QS. Or, d'après l'étude de la localisation des cellules dans les matrices alginate/caséinate liquides ou gélifiées, les cellules se concentrent dans les inclusions protéiques créant des microdomaines à forte concentration en cellules, ce qui pourrait favoriser le déclenchement d'un mécanisme de QS et la production d'actifs antimicrobiens.

Conclusion générale et perspectives

Le développement de la biopréservation contre les pathogènes d'origine alimentaire par une culture protectrice repose sur deux stratégies principales (Gaggia *et al.*, 2011) :

- l'inoculation avec une culture protectrice de la matrice alimentaire pour une production *in situ* des molécules inhibitrices ou un effet de compétition ;
- l'utilisation des métabolites antimicrobiens purifiés (en particulier les bactériocines) en surface ou dans la matrice alimentaire.

La stratégie développée lors du projet qui a donné lieu à ce travail de thèse est tout à fait innovante : mettre en œuvre un système polymérique protéine/polyoside incorporant des cellules entières de LAB bioprotectrices. En effet, l'approche qui consiste à mettre en œuvre des « bactériocines purifiées » possède au moins deux inconvénients : un coût non négligeable pour les étapes de purification (De Arauz *et al.*, 2009) et des risques accrus de résistance à ces bactériocines de la part des bactéries pathogènes. Il a été rapporté que lorsque certaines bactéries à Gram positif sont exposées de façon répétée à des concentrations croissantes d'une bactériocine seule, comme la nisine, elles peuvent acquérir un mécanisme de résistance (Zhou *et al.*, 2013). Jusqu'à présent, ce phénomène a été observé pour plusieurs espèces : *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus* ou encore *Staphylococcus aureus* (Zhou *et al.*, 2013). Dans ce contexte, un avantage primordial de l'utilisation des cellules entières résiderait donc dans la production simultanée *in situ* d'un large spectre de molécules antimicrobiennes : acides organiques, CO₂, peroxydes, diacétyle, bactériocines, ...

D'un point de vue fondamental, l'objectif de cette thèse était de comprendre comment la structure du système polymérique et le confinement des LAB pouvaient influencer sur leur viabilité et leur activité antimicrobienne. Ce travail a permis d'acquérir de nombreuses informations sur les systèmes alginate/caséinate liquides et gélifiés incorporant des souches de LAB ouvrant ainsi vers des perspectives à court terme mais également à plus long terme avec un volet applicatif.

Dix-neuf souches de LAB présentes dans la souche de laboratoire BioDyMIA et d'Actalia ont été testées pour leur propriété de bioprotection contre trois souches de *Listeria* spp. (*L. monocytogenes* S162, *L. innocua* LRGIA01, *L. innocua* ATCC 33090). Quatre souches ont été sélectionnées :

- deux souches de *Lactobacillus paracasei* : LAB1 et LAB2,
- une souche de *Lactococcus lactis* : LAB3,
- une souche d'*Enterococcus faecalis* : S14.

Les cultures de LAB ont été réalisées dans les conditions suivantes : milieu MRS_b, anaérobie, à 30°C. L'activité antimicrobienne a été testée selon la méthode de diffusion en puits en milieu gélosé. Les diamètres d'inhibition relevés pour les souches sélectionnées ont été supérieurs à 5 mm, traduisant une activité anti-*Listeria* intéressante. Les niveaux d'activité anti-*Listeria* des surnageants de culture natifs, des surnageants de culture neutralisés et des cultures entières ont généralement été similaires. Cela indique que les molécules antimicrobiennes ne sont pas restées adsorbées sur la membrane des cellules productrices. Les protocoles de confinement des cellules de LAB dans les matrices polymériques (alginate et alginate/caséinate) ont été mis en œuvre. Les matrices incorporant des cellules de LAB1, LAB2 ou LAB3 ont alors été testées pour leur potentiel antimicrobien. La souche S14 a démontré un comportement différent. Les travaux sur cette souche et sur d'autres souches devront donc être poursuivis.

Pour essayer de mieux comprendre l'action antimicrobienne des matrices polymériques développées, il était intéressant d'identifier les mécanismes principaux mis en œuvre par les souches de LAB sélectionnées. Pour LAB1 et LAB2, les deux souches de *Lactobacillus paracasei*, la pré-caractérisation des métabolites antimicrobiens a montré que leur activité antimicrobienne est en grande partie due à des peptides thermolabiles qui pourraient être considérés comme des bactériocines de classe III ou IV. La troisième souche principalement sélectionnée, *Lactococcus lactis* LAB3, produit de l'acide lactique dont la concentration atteint en fin de culture 13 g.L⁻¹. Mais l'effet pH n'est pas le mécanisme majoritaire de l'action antimicrobienne de cette souche. Un protocole de caractérisation, plus avancé que celui pour LAB1 et LAB2, a permis d'identifier un ou deux peptides antimicrobiens de 4,5-4,6 kDa de poids moléculaires. Leur identification complète (séquençage) n'a pas pu aboutir à ce jour mais sera poursuivie.

Les cellules de LAB (LAB1, LAB2 et LAB3) ont été confinées dans des systèmes alginate de sodium/caséinate de sodium avec la formulation : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % (m/m) MRS_b. Cette formulation se situe dans la zone d'incompatibilité du mélange présentant une microstructure s'apparentant à une émulsion avec une phase continue d'alginate et une phase dispersée de caséinate de sodium. L'ajout du milieu MRS_b ne semble pas perturber l'équilibre du mélange d'un point de vue macroscopique et microscopique. En revanche, l'apport du milieu MRS_b est essentiel ; les cellules de LAB3 ont montré une meilleure cultivabilité de plus de 1 log par mL ou par bille par rapport à des systèmes sans MRS_b.

En conséquence, de meilleures activités antimicrobiennes ont également été observées avec les mélanges contenant du MRS_b.

Pour les trois souches de LAB sélectionnées (*Lactobacillus* et *Lactococcus*), une localisation préférentielle des cellules a été observée dans la phase protéique que ce soit dans les systèmes liquides ou gélifiés. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ce phénomène de partage : rôle des interactions hydrophobes et/ou phénomène de déplétion. Il est difficile d'effectuer une comparaison du fait du manque de littérature sur des systèmes similaires au nôtre. D'autres polymères ou d'autres formulations pour ce même système devront être testés pour élargir cette approche et confirmer ces hypothèses.

Une fois les cellules incorporées dans les matrices d'alginate/caséinate liquides ou gélifiées, les souches de LAB sélectionnées ont conservé leur potentiel bioprotecteur pendant 12 jours de stockage à 30°C. Les matrices d'alginate/caséinate se sont avérées plus actives contre *Listeria* spp. que les matrices d'alginate et ce, pour les trois souches de LAB confinées testées. Plusieurs paramètres peuvent expliquer ce phénomène :

- (i), une meilleure survie des cellules en présence de caséinate : environ 1 log UFC.mL⁻¹ ou UFC/bille en plus ;
- (ii), une meilleure production d'actifs antimicrobiens ;
- (iii), une meilleure libération des composés antimicrobiens de la matrice vers le milieu gélosé.

Deux de ces facteurs ont été démontrés : (i) et (iii).

La meilleure survie des cellules en présence de caséinate pourrait s'expliquer par un apport supplémentaire en nutriments par les caséinates et/ou par un effet tampon des caséinates réduisant le stress acide des cellules de LAB.

La meilleure capacité de libération des composés antimicrobiens des matrices d'alginate/caséinate pourrait être due à des différences d'interactions entre les composants de la matrice et les molécules antimicrobiennes et/ou à des effets de structures de la matrice. L'identification prochaine des peptides antimicrobiens produits par les souches de LAB sélectionnées permettra d'approfondir ces hypothèses de travail.

Une meilleure production d'actifs antimicrobiens dans les matrices d'alginate/caséinate n'a pas pu être clairement démontrée, néanmoins les résultats permettent de lier l'activité antimicrobienne à la densité cellulaire. Comme la survie des LAB est plus importante dans les

matrices d'alginate/caséinate, la production d'actifs antimicrobiens serait donc plus conséquente et donc l'activité antimicrobienne, qui en découlerait, serait augmentée. Une grande partie des études concernant la production de molécules antimicrobiennes par les LAB a révélé une régulation par le mécanisme de « Quorum Sensing » (Dobson *et al.*, 2012). Nos observations iraient donc dans ce sens. Le système polymérique de confinement prendrait alors tout son intérêt. En effet, l'étude de la localisation des cellules dans les matrices alginate/caséinate liquides ou gélifiées a montré que les cellules se concentrent dans les inclusions protéiques créant des microdomaines à forte concentration cellulaire, ce qui pourrait favoriser le déclenchement d'une régulation de la production d'actifs antimicrobiens par un mécanisme de « Quorum Sensing ».

De plus, les matrices liquides et gélifiées ont été chargées en cellules avec deux inocula : C1, 10^{8-10} UFC.mL⁻¹ de matrice gélifiante et C2, 10^{4-6} UFC.mL⁻¹ de matrice gélifiante. Dans le cas de la charge C1, une activité antimicrobienne a été détectée dès l'incorporation des cellules dans les matrices, alors que dans le cas de la charge C2, l'activité antimicrobienne est retardée de 24h. Dans ce dernier cas, les cellules se multiplient pendant ces 24 premières heures pour atteindre la charge de l'inoculum C1, alors que dans le cas de la charge C1, les cellules n'ont qu'à maintenir la population et produisent instantanément des actifs antimicrobiens. Cette observation va aussi dans le sens d'une régulation de la production d'actifs antimicrobiens par le phénomène de « Quorum Sensing ». Dans la perspective d'une application, le choix de la charge initiale serait donc un facteur important en fonction du moment où l'effet inhibiteur est désiré. Si une activité antimicrobienne est recherchée immédiatement, une charge initiale élevée s'imposerait, si on souhaite une activité différée, la charge moins importante serait suffisante.

Plusieurs axes peuvent être envisagés pour compléter et poursuivre les investigations.

À court terme, l'identification des molécules antimicrobiennes produites par les LAB, qui a déjà été bien avancée (détermination de la nature peptidique pour LAB1 et LAB2, et obtention d'un poids moléculaire pour LAB3), devrait aller à son terme.

Dans cette étude, chaque souche de LAB a été confinée séparément. En perspective, il peut être envisagé d'utiliser des co-cultures de LAB pour diversifier la nature des molécules antimicrobiennes produites et/ou renforcer la production de molécules antimicrobiennes (Man *et al.*, 2012).

De plus, il serait intéressant d'étudier le mode d'action des actifs antimicrobiens libérés sur les souches cibles. Par exemple, les méthodes de spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) et/ou de spectrofluorimétrie pourraient être utilisées (Chadeau *et al.*, 2012). Ces méthodes sont

complémentaires : la première permet d'étudier l'intégrité des membranes biologiques sans insérer de marqueurs ; la seconde permet d'évaluer la fluidité membranaire des bactéries cibles en présence de sondes fluorescentes et ainsi évaluer si la structure et la fluidité de la membrane des bactéries cibles sont affectées.

Ce travail de thèse innovant a été mené principalement contre *Listeria* spp., une des perspectives serait donc d'élargir le spectre en testant d'autres souches cibles à Gram positif et à Gram négatif. En effet, même si la plupart des bactériocines produites par des lactococoques n'ont pas d'action contre les bactéries à Gram négatif, il est possible d'ajouter des agents chélatants, comme l'acide citrique ou l'EDTA, pour perturber la membrane extérieure de ces bactéries permettant par la suite l'action des bactériocines (Zendo *et al.*, 2010).

D'un point de vue applicatif, deux secteurs pourraient être ciblés : les emballages en agroalimentaire et les probiotiques.

Ce type de matrice polymérique incorporant des cellules entières de LAB bioprotectrices pourraient permettre de protéger la surface d'aliments, par exemple en imaginant un dispositif d'intercalaire. Les matrices polymériques contenant les cellules de LAB ont été principalement stockées à 30°C pour, dans un premier temps, se placer à des températures optimales pour l'activité antimicrobienne des cellules de LAB et pour également simuler une rupture de la chaîne du froid. Ils seraient intéressants, dans un objectif applicatif, de se rapprocher des conditions normées par les deux normes suivantes : NF 01-003 (Test de vieillissement) et NF 01-009 (Test de croissance ou challenge test). Sur un produit cible (fromages, viandes tranchées), le test de vieillissement permettrait d'étudier la flore naturellement présente dans l'aliment et de déterminer une durée de vie microbiologique et, le challenge test permettrait de suivre l'évolution d'une population de microorganismes inoculés de manière volontaire. Ce dernier test fournirait des informations sur l'efficacité du dispositif bioprotecteur ajouté. Dans la majorité des cas, les challenge tests sont effectués soit avec un pathogène de référence (comme *Listeria monocytogenes*), soit avec des flores d'altération (type levures, moisissures).

Ce système polymérique protéine/polyoside pourrait également permettre d'encapsuler des souches probiotiques. Pour exercer leur effet bénéfique pour la santé, les probiotiques doivent se retrouver vivants au niveau intestinal après avoir été consommés. Ils doivent donc passer la barrière de l'estomac qui est un obstacle du fait de l'acidité qui y règne. Le système d'immobilisation original protéine/polyoside pourrait participer à améliorer la survie des probiotiques, notamment grâce à leur localisation préférentielle dans la phase interne de la matrice.

La maîtrise et la compréhension des problématiques mises en avant lors de ce travail de thèse permettront le développement de nouveaux outils de bioprotection avec des bactéries lactiques incorporées dans des matrices biopolymériques qui représentent une nouvelle approche prometteuse pour le contrôle de la croissance des microorganismes pathogènes dans le domaine de l'agroalimentaire.

A

- AFNOR** (Agence Française de Normalisation), **NF B 51-004** Bois-détermination de l'humidité. (1985).
- AFNOR** (Agence Française de Normalisation), **NF M 03-003** Détermination du taux de cendre. (1994).
- Aguirre, M. et Collins, M. D.** (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Microbiology*, **75**, 95–107.
- Agulhon, P.** (2012). De la complexation des cations d'intérêt : les gels ionotropiques d'alginate. *PhD thesis, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier*.
- Alkhatib, Z., Abts, A., Mavaro, A., Schmitt, L., et Smits, S. H.** (2012). Lantibiotics: how do producers become self-protected? *Journal of Biotechnology*, **159**, 145–154.
- Alpay-Karaoglu, S., Aydin, F., Kilic, S. S., et Kilic, A. O.** (2003). Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **33**, 7–13.
- Alves, M. M., Garnier, C., Lefebvre, J., et Gonçalves, M. P.** (2001). Microstructure and flow behaviour of liquid water-gelatin-locust bean gum systems. *Food hydrocolloids*, **15**, 117–125.
- Aly, S., Flourey, J., Famelart, M.-H., Madec, M.-N., Dupont, D., Le Gouar, Y., Lortal, S., et Jeanson, S.** (2011). Nisin quantification by ELISA allows the modeling of its apparent diffusion coefficient in model cheeses. *Journal of agricultural and food chemistry*, **59**, 9484–9490.
- Amara, N., Krom, B. P., Kaufmann, G. F., et Meijler, M. M.** (2010). Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond. *Chemical reviews*, **111**, 195–208.
- Abo-Amer, A. E., El-Deep, B. A., et Altalhi, A. D.** (2008). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AA135. *Roumanian archives of microbiology and immunology*, **67**, 36.
- Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., et Chevallier, I.** (2005). Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food microbiology*, **22**, 529–538.
- 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.
- An, Y. H., Blair, B. K., Martin, K. L., et Friedman, R. J.** (1997). Macromolecule Surface Coating for Preventing Bacterial Adhesion - Springer. *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications*, 609-625.
- Ananou, S., Garriga, M., Jofré, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., et Valdivia, E.** (2010). Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat science*, **84**, 594–600.
- Andrade, J. C., Ferreira, M., Cardoso, S., et Cardoso, C.** (2010). Microencapsulation of probiotic bacteria in alginate-protein mixtures. *XVIII International Conference on Bioencapsulation Porto, Portugal*.

http://impascience.eu/bioencapsulation/340_contribution_texts/2010-10-01_P-102.pdf

Antonov, Y. A., Grinberg, V. Y., Zhuravskaya, N., et Tolstoguzov, V. (1980). Liquid two-phase water-protein-polysaccharide systems and their processing into textured protein products. *Journal of Texture Studies*, **11**, 199–215.

Antonov, Y. A. et Moldenaers, P. (2011). Structure formation and phase-separation behaviour of aqueous casein-alginate emulsions in the presence of strong polyelectrolyte. *Food Hydrocolloids*, **25**, 350-360.

Antonov, Y. A., Van Puyvelde, P., et Moldenaers, P. (2004). Interfacial tension of aqueous biopolymer mixtures close to the critical point. *International journal of biological macromolecules*, **34**, 29–35.

Antonov, Y. et Friedrich, C. (2007). Aqueous phase-separated biopolymer mixture compatibilized by physical interactions of the constituents. *Polymer Bulletin*, **58**, 969–978.

Antov, M. G. et Pericin, D. M. (2001). Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 467-472.

Antov, M. G., Pericin, D. M., et Dimić, G. R. (2001). Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste. *Journal of biotechnology*, **91**, 83–87.

Asakura, S. et Oosawa, F. (1954). On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *The Journal of Chemical Physics*, **22**, 1255.

Aslim, B. et Alp, G. (2009). The effect of immobilization on some probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* strains. *Annals of Microbiology*, **59**, 127–132.

Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J.-M., Dousset, X., Ivanova, I., et Haertlé, T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*, **87**, 63-73.

Audet, P., Paquin, C., et Lacroix, C. (1988). Immobilized growing lactic acid bacteria with κ -carrageenan - locust bean gum gel. *Applied Microbiology Biotechnology*, **29**, 11-18.

Auty, M. A. E., Gardiner, G. E., McBrearty, S. J., O'sullivan, E. O., Mulvihill, D. M., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., et Ross, R. P. (2001). Direct *in situ* viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Applied and environmental microbiology*, **67**, 420–425.

Avena-Bustillos, R. J. et Krochta, J. M. (1993). Water Vapor Permeability of Caseinate-Based Edible Films as Affected by pH, Calcium Crosslinking and Lipid Content. *Journal of food science*, **58**, 904–907.

B

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I. M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., et García-García, I. (2006). Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry*, **41**, 1160–1164.

Bauer, S. A. W., Schneider, S., Behr, J., Kulozik, U., et Foerst, P. (2012). Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low-temperature vacuum drying. *Journal of Biotechnology*, **159**, 351-357.

Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., et Van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a

novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **7**, 47–53.

Bendali, F., Gaillard-Martinie, B., Hebraud, M., et Sadoun, D. (2008). Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 1784–1792.

Benkerroum, N., Daoudi, A., Hamraoui, T., Ghalfi, H., Thiry, C., Duroy, M., Evrart, P., Roblain, D., et Thonart, P. (2004). Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *Journal of applied microbiology*, **98**, 56–63.

Benkerroum, N. et Sandine, W. E. (1988). Inhibitory Action of Nisin Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, **71**, 3237-3245.

Bertrand, A. L., Morrier, J. J., Benay, G., Lissac, M., et Barsotti, O. (2003). Etude « in vitro » de l'adhérence de « *Streptococcus mutans* » sur un alliage niti utilisé en orthodontie. *Les cahiers de l'ADF*, **14-15**, 50-55.

Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., et Corbo, M. R. (2010). An acid/alkaline stress and the addition of amino acids induce a prolonged viability of *Lactobacillus plantarum* loaded into alginate gel. *International Journal of Food Microbiology*, **142**, 242-246.

Bierbaum, G. et Sahl, H.-G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current pharmaceutical biotechnology*, **10**, 2–18.

Birkemo, G. A., Lüders, T., Andersen, Ø., Nes, I. F., et Nissen-Meyer, J. (2003). Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1646**, 207-215.

Blom, H., Katla, T., Hagen, B. F., et Axelsson, L. (1997). A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, **38**, 103-109.

Blonk, J. C. G., Van Eendenburg, J., Koning, M. M. G., Weisenborn, P. C. M., et Winkel, C. (1995). A new CSLM-based method for determination of the phase behaviour of aqueous mixtures of biopolymers. *Carbohydrate polymers*, **28**, 287–295.

Bonnet, M. et Montville, T. J. (2005). Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Letters in applied microbiology*, **40**, 237–242.

Boonaert, C. J. ., Dufrêne, Y. F., Derclaye, S. R., et Rouxhet, P. G. (2001). Adhesion of *Lactococcus lactis* to model substrata: direct study of the interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **22**, 171-182.

Boonaert, C. J. P. et Rouxhet, P. G. (2000). Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Applied and environmental microbiology*, **66**, 2548.

Boris, S., Jiménez-Díaz, R., Caso, J., et Barbes, C. (2001). Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. *Journal of applied microbiology*, **91**, 328–333.

Bouksaim, M., Fliss, I., Meghrous, J., Simard, R., et Lacroix, C. (1998). Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. *Journal of applied microbiology*, **84**, 176–184.

Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., et Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total

bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, **37**, 77–86.

Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., et Haesebrouck, F. (2009). Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary microbiology*, **135**, 187–195.

Brachkova, M. I., Duarte, M. A., et Pinto, J. F. (2010). Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. in calcium alginate beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41**, 589–596.

Brault, D., D'Aprano, G., et Lacroix, M. (1997). Formation of free-standing sterilized edible films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 2964–2969.

Breeuwer, P. et Abee, T. (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International journal of food microbiology*, **55**, 193–200.

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.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Garrity, G. M., et Staley, J. T. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria Springer.

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.

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 Food Protection*®, **60**, 254–261.

Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., et Glaser, P. (2006). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **35**, 207–213.

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.

Bury, D., Jelen, P., et Kimura, K. (1998). Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **8**, 149–151.

Butler, M. F. et Heppenstall-Butler, M. (2003). Phase separation in gelatin/dextran and gelatin/maltodextrin mixtures. *Food Hydrocolloids*, **17**, 815–830.

C

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.

Caplice, E. et Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, **50**, 131–149.

Capron, I., Costeux, S., et Djabourov, M. (2001). Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions. *Rheologica acta*, **40**, 441–456.

Capron, I., Nicolai, T., et Durand, D. (1999). Heat induced aggregation and gelation of β -

lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, **13**, 1–5.

Carpentier, B. et Cerf, O. (2011). Review—Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology*, **145**, 1–8.

Caserta, S., Sabetta, L., Simeone, M., et Guido, S. (2005). Shear-induced coalescence in aqueous biopolymer mixtures. *Chemical Engineering Science*, **60**, 1019-1027.

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.

Castellano, P., Vignolo, G., Farias, R. N., Arrondo, J. L., et Chehin, R. (2007). Molecular view by fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. *Applied and environmental microbiology*, **73**, 415.

Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., et Campos, C. A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, **87**, 321–329.

Cataldo, G., Conte, M. P., Chiarini, F., Seganti, L., Ammendolia, M. G., Superti, F., et Longhi, C. (2007). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal of applied microbiology*, **103**, 185–193.

Chadeau, E. (2011). Caractérisation des propriétés antibactériennes de textiles fonctionnalisés avec de l'argent ou du PolyHexaMéthylène Biguanide (PHMB). *PhD thesis, Université Claude Bernard Lyon I*.

Chadeau, E., Dumas, E., Adt, I., Degraeve, P., Noël, C., Girodet, C., et Oulahal, N. (2012). Assessment of the mode of action of polyhexamethylene biguanide against *Listeria innocua* by Fourier transformed infrared spectroscopy and fluorescence anisotropy analysis. *Canadian journal of microbiology*, **58**, 1353–1361.

Chadeau, E., Oulahal, N., Dubost, L., Favergeon, F., et Degraeve, P. (2010). Anti-*Listeria innocua* activity of silver functionalised textile prepared with plasma technology. *Food control*, **21**, 505–512.

Champagne, C. P., Gagnon, D., St-Gelais, D., et Vuilleumard, J. C. (2009). Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. *International Dairy Journal*, **19**, 669–674.

Chandrapati, S. et O'Sullivan, D. J. (1998). Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of biotechnology*, **63**, 229–233.

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.

Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P., et Vauthier, C. (2004). A new approach for the characterization of insoluble amphiphilic copolymers based on their emulsifying properties. *Colloid & Polymer Science*, **282**, 1097–1104.

Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., Hwang, J. K., et Pyun, Y. R. (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of biotechnology*, **95**, 225–235.

Chen, H. (2002). Formation and properties of casein films and coatings. In *Protein-based films and coatings.*, p. 181-211.

- Chen, H. et Hoover, D. G.** (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **2**, 82–100.
- Christensen, M. D. et Pederson, C. S.** (1958). Factors Affecting Diacetyl Production by Lactic Acid Bacteria. *Appl Microbiol*, **6**, 319-322.
- Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E., et Dobrogosz, W. J.** (1989). In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial ecology in health and disease*, **2**, 137–144.
- Claisse, O. et Lonvaud-Funel, A.** (2000). Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food microbiology*, **17**, 513–519.
- Clark, A. H., Eyre, S. C. E., Ferdinando, D. P., et Lagarrigue, S.** (1999). Interpenetrating network formation in gellan-maltodextrin gel composites. *Macromolecules*, **32**, 7897–7906.
- Çon, A. H., Gökalp, H. Y., et Kaya, M.** (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, **59**, 437-441.
- Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., et Fuentes, R.** (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, **22**, 485-489.
- Corrieu, G. et Luquet, F. M.** (2008). Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris : Édition Tec et Doc, p. 849.
- Cotter, P. D., Hill, C., et Ross, R. P.** (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 777–788.
- Cretenet, M., Laroute, V., Ulvé, V., Jeanson, S., Nouaille, S., Even, S., Piot, M., Girbal, L., Loir, Y. L., Loubière, P., et al.** (2011). Dynamic Analysis of the *Lactococcus lactis* Transcriptome in Cheeses Made from Milk Concentrated by Ultrafiltration Reveals Multiple Strategies of Adaptation to Stresses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 247-257.
- Cuomo, F., Ceglie, A., et Lopez, F.** (2011). Temperature dependence of calcium and magnesium induced caseinate precipitation in H₂O and D₂O. *Food Chemistry*, **126**, 8–14.
- Czajka, J., Bsat, N., Piani, M., Russ, W., Sultana, K., Wiedmann, M., Whitaker, R., et Batt, C. A.** (1993). Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *Applied and environmental microbiology*, **59**, 304–308.
- Czaran, T. et Hoekstra, R. F.** (2007). A spatial model of the evolution of quorum sensing regulating bacteriocin production. *Behavioral Ecology*, **18**, 866–873.

D

- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., et Hill, C.** (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International journal of food microbiology*, **153**, 58–65.
- 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.
- Da Silva Malheiros, P. da S., Daroit, D. J., et Brandelli, A.** (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese by free and nanovesicle-encapsulated nisin. *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**, 1414-1418.
- De Angelis, M. et Gobbetti, M.** (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, **4**, 106–122.

- De Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., et Vessoni Penna, T. C.** (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, **20**, 146-154.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., et Ross, P.** (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, **16**, 1058–1071.
- De Kruif, C. G. et Tuinier, R.** (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food hydrocolloids*, **15**, 555–563.
- De Kruif, C. G. et Tuinier, R.** (1999). Whey protein aggregates and their interaction with exopolysaccharides. *International Journal of Food Sciences and Technologies*, **34**, 487.
- De La Salles, K. T. da S., Canselier, J. P., et Gourdon, C.** (2005). Characterization of a Two-Aqueous Phase System Containing a Nonionic Surfactant. *Journal of dispersion science and technology*, **26**, 303–313.
- De Man, J. C., Rogosa, M., et Sharpe, M. E.** (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, **23**, 130–135.
- De Muynck, C., Leroy, A. I., De Maeseineire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., et Vandamme, E. J.** (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, **159**, 339–346.
- Desjardins, P., Meghrou, J., et Lacroix, C.** (2001). Effect of aeration and dilution rate on nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized *Lactococcus lactis* UL719 in supplemented whey permeate. *International dairy journal*, **11**, 943–951.
- 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.
- De Vuyst, L.** (1995). Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *Journal of Applied Microbiology*, **78**, 28–33.
- De Vuyst, L. et Vandamme, E. J.** (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*, **138**, 571–578.
- Dobrogosz, W. J., Casas, I. A., Pagano, G. A., Talarico, T. L., Sjoberg, B. M., et Karlsson, M.** (1989). *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota. In, *The regulatory and protective role of the normal microflora.*, p. 283-292.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., et Hill, C.** (2012). Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 1-6.
- Doleyres, Y. et Lacroix, C.** (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*, **15**, 973-988.
- Donato, L.** (2004). Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques. *PhD thesis, Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Nantes.*
- 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.
- Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D., et Sanchez, C.** (2000). Protein–polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **5**, 202–214.

Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., et Boury, F. (2004). Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **232**, 239-247.

E

Edmond, E. et Ogston, A. G. (1968). An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems. *Biochemical Journal*, **109**, 569.

Eijsink, V. G. ., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B., et Nes, I. F. (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3275.

Enan, G., El-Essawy, A. A., Uyttendaele, M., et Debevere, J. (1996). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *International journal of food microbiology*, **30**, 189–215.

Enitan, A., Adeyemo, J., et Ogunbanwo, S. T. (2011). Influence of growth conditions and nutritional requirements on the production of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, 2059–2066.

Ercolini, D., Ferrocino, I., La Storia, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., et Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food microbiology*, **27**, 137–143.

F

Fabra, M. J., Talens, P., et Chiralt, A. (2010). Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *Journal of Food Engineering*, **96**, 356–364.

Falahee, M. B. et Adams, M. R. (1992). Cross-reactivity of bacteriocins from lactic acid bacteria and antibiotics in a nisin bioassay and ELISA. *Letters in Applied Microbiology*, **15**, 214-216.

Falahee, M. B., Adams, M. R., Dale, J. W., et Morris, B. A. (1990). An enzyme immunoassay for nisin. *International Journal of Food Science and Technology*, **25**, 590-595.

Farber, J. M. et Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, **55**, 476.

Flory, P. J. (1942). Thermodynamics of high polymer solutions. *The Journal of chemical physics*, **10**, 51.

G

Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., et Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, **22**, S58–S66.

Gandhi, M. et Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*, **113**, 1–15.

Garcia-Almendarez, B. E., Cann, I. K., Martin, S. E., Guerrero-Legarreta, I., et Regalado, C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms.

Food Control, **19**, 670–680.

Garcia-Parra, M. D., Garcia-Almendárez, B. E., Guevara-Olvera, L., Guevara-González, R. G., Rodriguez, A., Martinez, B., Dominguez-Dominguez, J., et Regalado, C. (2011). Effect of sub-inhibitory amounts of nisin and mineral salts on nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 in skim milk. *Food and Bioprocess Technology*, **4**, 646–654.

Gatti, M., Bernini, V., Lazzi, C., et Neviani, E. (2006). Fluorescence microscopy for studying the viability of micro-organisms in natural whey starters. *Letters in applied microbiology*, **42**, 338–343.

Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., et Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. *International journal of food microbiology*, **129**, 103–105.

Ge, J., Fang, B., Yuan, T., et Ping, W. (2011). Quorum-sensing behavior of *Lactobacillus paracasei* HD1.7. *Wei Sheng Wu Xue Bao Acta microbiologica Sinica*, **51**, 1561-1567.

Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., et Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, **43**, 2402-2408.

Giaouris, E., Chapot-Chartier, M.-P., et Briandet, R. (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International journal of food microbiology*, **131**, 2–9.

Gibbons, R. J. et Etherden, I. (1983). Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infection and immunity*, **41**, 1190–1196.

Gillor, O., Etzion, A., et Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, **81**, 591–606.

Gombotz, W. R. et Wee, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, Supplement, 194-205.

Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., et De Valk, H. (2008). Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging infectious diseases*, **14**, 734.

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.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., et Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **32**, 195-198.

Grasdalen, H. (1983). High-field, ¹H-NMR spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, **118**, 255–260.

Grasdalen, H., Larsen, B., et Smidsrød, O. (1979). A p.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydrate Research*, **68**, 23–31.

Grinberg, V. Y. et Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, **11**, 145-158.

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.

Guido, S., Simeone, M., et Alfani, A. (2002). Interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate by drop deformation in shear flow. *Carbohydrate polymers*, **48**, 143–152.

H

Hamley, I.W., Dehsorkhi, A., Jauregi, P., Seitsonen, J., Ruokolainen, J., Coutte, F., Chataigné, G., et Jacques, P. (2012). Self-assembly of three bacterically-derived bioactive lipopeptides. *Soft Matter*. DOI: 10.1039/c3sm51514a.

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., et McClements, D. (2006). Characterization of [beta]-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, **20**, 577–585.

Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E., et Klaenhammer, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **52**, 3784–7.

Hartmann, H. A., Wilke, T., et Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, **146**, 192–199.

Hayes, C. S. et Low, D. A. (2009). Signals of growth regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **12**, 667-673.

Helander, I., Von Wright, A., et Mattila-Sandholm, T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, **8**, 146–150.

Héquet, A., Laffitte, V., Brocail, E., Aucher, W., Cenatiempo, Y., Frère, J., Fremaux, C., et Berjeaud, J. M. (2009). Development of a new method for the detection of lactic acid bacteria capable of protecting ham against Enterobacteriaceae. *Letters in applied microbiology*, **48**, 668–674.

Héquet, A., Laffitte, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fremaux, C., et Berjeaud, J.-M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *International journal of food microbiology*, **113**, 67–74.

Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.-E., Aukrust, T., et Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of general microbiology*, **138**, 2715-2720.

Hsiao, C.-P. et Siebert, K. J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International journal of food microbiology*, **47**, 189–201.

Hugenholtz, J. et Kleerebezem, M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current opinion in biotechnology*, **10**, 492–497.

Huggins, M. L. (1942). Theory of solutions of high polymers¹. *Journal of the American Chemical Society*, **64**, 1712–1719.

I

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.

Infelta, P. et Graetzel, M. (2006). Thermodynamique : Principes et Applications. Boca Raton : Brown Walker Press.

Iseppi, R., de Niederhäusern, S., Anacarso, I., Messi, P., Sabia, C., Pilati, F., Toselli, M., Degli Esposti, M., et Bondi, M. (2011). Anti-listerial activity of coatings entrapping living bacteria. *Soft Matter*, **7**, 8542–8548.

Ivanova, E., Chipeva, V., Ivanova, I., Dousset, X., et Poncelet, D. (2002). Encapsulation of lactic acid bacteria in calcium alginate beads for bacteriocin production. *Journal of Culture Collections*, **3**, 53–58.

Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J., et Sonomoto, K. (2007). Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **71**, 1984–1992.

J

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.

Jiang, J., Shi, B., Zhu, D., Cai, Q., Chen, Y., Li, J., Qi, K., et Zhang, M. (2012). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control*, **23**, 338–344.

Jones, O. G. et McClements, D. J. (2010). Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes. *Advances in colloid and interface science*, **167**, 49–62.

Jones, R. J., Hussein, H. M., Zagorec, M., Brightwell, G., et Tagg, J. R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, **25**, 228–234.

Joux, F. et Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, **2**, 1523–1535.

Jozala, A. F., Célia de Lencastre Novaes, L., Cholewa, O., Moraes, D., et Penna, T. C. V. (2005). Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African Journal of Biotechnology*, **4**, 262–265.

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.

K

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, **3**, 39–48.

Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, **31**, 224–245.

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

Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, **46**, 233–244.

Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, **65**, 1811–1829.

- Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. I. ., Cha, D. S., et Park, H. J.** (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 493–500.
- Klaenhammer, T. R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, **12**, 39–85.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E. N., Kuipers, O. P., et De Vos, W. M.** (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, **24**, 895–904.
- Koo, O.-K., Eggleton, M., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., et Ricke, S. C.** (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on frankfurters formulated with and without lactate/diacetate. *Meat Science*, **92**, 533–537.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G. G. ., Luesink, E. J., et de Vos, W. M.** (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 27299.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerebezem, M., et de Vos, W. M.** (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, **64**, 15–21.
- 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.
- ## L
- Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., et Ouhssine, M.** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin-societe de pharmacie de bordeaux*, **144**, 237.
- Lacroix, C. et Yildirim, S.** (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**, 176-183.
- Lambertz, S. T., Nilsson, C., Brådenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L.-M., et Lindblad, M.** (2012). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, **160**, 24-31.
- Lambole, L., Lacroix, C., Champagne, C. P., et Vuilleumard, J. C.** (1997). Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology. *Biotechnology and bioengineering*, **56**, 502–516.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., et Gardini, F.** (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, **20**, 537-543.
- Lee, J. S., Cha, D. S., et Park, H. J.** (2004). Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of agricultural and food chemistry*, **52**, 7300–7305.
- Lee, K. H., Choi, I. S., Kim, Y.-G., Yang, D.-J., et Bae, H.-J.** (2011). Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource technology*, **102**, 8191–8198.
- Lee, K.-K. et Yii, K.-C.** (1996). A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. *Letters in applied microbiology*, **23**, 343–346.

- Lehrke, G., Hernaez, L., Mugliaroli, S. L., von Staszewski, M., et Jagus, R. J.** (2011). Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural antimicrobials. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 984-991.
- Leja, K., Dembczyński, R., Bialas, W., et Jankowski, T.** (2009). Production of dry *Lactobacillus rhamnosus* GG preparations by spray drying and lyophilization in aqueous two-phase systems. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria*, **8**, 39-49.
- Lemay, G.** (2000). Etude de la stabilité thermique des protéines de lactosérum et de leur comportement en solution, en présence de divers dextrans. *PhD thesis, Département de sciences des aliments et de nutrition, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval*.
- Léonard, L., Gharsallaoui, A., Ouaali, F., Degraeve, P., Waché, Y., Saurel, R., et Oulahal, N.** (2013). Preferential localization of *Lactococcus lactis* cells entrapped in a caseinate/alginate phase separated system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **109**, 266-272.
- Lepoudère, A., Snappe, J.-J., et Sredzinski, N.** (2012). Protéines laitières. *Dossier Techniques de l'Ingénieur*.
- Leroi, F.** (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food microbiology*, **27**, 698-709.
- Leroy, F. et Vuyst, L. D.** (2001). Growth of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494 in MRS Broth Is Strongly Reduced Due to Nutrient Exhaustion: a Nutrient Depletion Model for the Growth of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4407-4413.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., et Ouyang, F.** (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, **93**, 27-34.
- Li, C., Ouyang, F., et Bai, J.** (2000). Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/MgSO₄.7H₂O aqueous two-phase system to produce nisin. *Biotechnology letters*, **22**, 843-847.
- Li, L., Fang, Y., Vreeker, R., Appelqvist, I., et Mendes, E.** (2007). Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, **8**, 464-468.
- Li, X., Cheng, Y., Yi, C., Hua, Y., Yang, C., et Cui, S.** (2009). Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1015-1023.
- Little, C. L., Taylor, F. C., Sagoo, S. K., Gillespie, I. A., Grant, K., et McLauchlin, J.** (2007). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food microbiology*, **24**, 711-717.
- Liu, G., Lv, Y., Li, P., Zhou, K., et Zhang, J.** (2008). Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control*, **19**, 353-359.
- Liu, S.-Q.** (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International journal of food microbiology*, **83**, 115-131.
- Liu, X., Chung, Y.-K., Yang, S.-T., et Yousef, A. E.** (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*, **40**, 13-24.
- Liu, X., Qian, L., Shu, T., et Tong, Z.** (2003). Rheology characterization of sol-gel transition in

aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release. *Polymer*, **44**, 407-412.

Lopez-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., et Lagaron, J. M. (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food hydrocolloids*, **28**, 159–167.

Loren, N., Langton, M., et Hermansson, A.-M. (1999). Confocal laser scanning microscopy and image analysis of kinetically trapped phase-separated gelatin/maltodextrin gels. *Food Hydrocolloids*, **13**, 185–198.

Loubiere, P., Coccagn-Bousquet, M., Matos, J., Goma, G., et Lindley, N. d. (1997). Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, **82**, 95–100.

Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, **56**, 105–115.

Ly, Mai Huong, Aguedo, M., Goudot, S., Le, M. L., Cayot, P., Teixeira, J. A., Le, T. M., Belin, J.-M., et Waché, Y. (2008a). Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. *Food Hydrocolloids*, **22**, 742–751.

Ly, M. H., Covarrubias-Cervantes, M., Dury-Brun, C., Bordet, S., Voilley, A., Le, T. M., Belin, J.-M., et Wache, Y. (2008b). Retention of aroma compounds by lactic acid bacteria in model food media. *Food hydrocolloids*, **22**, 211–217.

Ly, Mai Huong, Naïtali-Bouchez, M., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.-N., Le, T. M., Belin, J.-M., et Waché, Y. (2006b). Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. *International journal of food microbiology*, **112**, 26–34.

Ly, M.H., Vo, N. H., Le, T. M., Belin, J.-M., et Waché, Y. (2006a). Diversity of the surface properties of Lactococci and consequences on adhesion to food components. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **52**, 149-153.

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

M

Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. *PhD thesis, Uppsala University*.

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.

Mall, P., Mohanty, B. K., Patankar, D. B., Mody, R., et Tunga, R. (2010). Physiochemical parameters optimization for enhanced nisin production by *Lactococcus lactis* (MTCC 440). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**, 203–209.

Man, L.-L., Meng, X.-C., et Zhao, R.-H. (2012). Induction of plantaricin MG under co-culture with certain lactic acid bacterial strains and identification of LuxS mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* KLDS1. 0391. *Food Control*, **23**, 462–469.

Mandal, S., Puniya, A. K., et Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International dairy journal*, **16**, 1190–1195.

Mandala, I., Michon, C., et Launay, B. (2004). Phase and rheological behaviors of xanthan/amylose and xanthan/starch mixed systems. *Carbohydrate polymers*, **58**, 285–292.

- Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J.-F., Dubois-Brissonnet, F., Notz, E., et Briandet, R.** (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control*, **22**, 1357–1362.
- Martinis, E. C. D., Públio, M. R., Santarosa, P. R., et Freitas, F. Z.** (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**, 32–37.
- Matalanis, A., Jones, O. G., et McClements, D. J.** (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1865–1880.
- Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Chadli, F. K., Cornet, J., Prevost, H., et Pilet, M. F.** (2009). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, **72**, 365–374.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., et Metaxopoulos, J.** (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4+/-2° C. *Food Microbiology*, **20**, 259–265.
- Matéos, A.** (2008). Etude protéomique de la microhétérogénéité des caséines alpha s1 et bêta équines : identification des variants post-transcriptionnels et de phosphorylation ; identification des sites phosphorylés de la caséine bêta. *PhD thesis INPL Nancy Université*.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., et Ishizaki, A.** (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 36–40.
- McAuliffe, O., Ross, R. P., et Hill, C.** (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, **25**, 285–308.
- McClements, D. J.** (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, **8**, 1719–1729.
- McClements, D. J.** (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology advances*, **24**, 621–625.
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., et Jewell, K.** (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International journal of food microbiology*, **92**, 15–33.
- Meghrou, J., Huot, E., Quittelier, M., et Petitdemange, H.** (1992). Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cell of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Research in microbiology*, **143**, 879–890.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., et Snabre, P.** (1999). Turbiscan MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, **50**, 445–456.
- Mesa, M. M., Macias, M., Cantero, D., et Barja, F.** (2003). Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *Journal of Fluorescence*, **13**, 261–265.
- Mession, J.-L., Assifaoui, A., Cayot, P., et Saurel, R.** (2012). Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate. *Food Hydrocolloids*, **29**, 335–346.
- Mierau, I., Olieman, K., Mond, J., et Smid, E. J.** (2005). Optimization of the *Lactococcus lactis*

- nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microbial cell factories*, **4**, 16.
- Miller, F. A., Ramos, B., Gil, M. M., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., et Silva, C. L. M.** (2009). Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, **133**, 121-128.
- Miller, M. B. et Bassler, B. L.** (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, **55**, 165–199.
- Millette, M., Smoragiewicz, W., et Lacroix, M.** (2004). Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *Journal of Food Protection*, **67**, 1184–1189.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., et Lacroix, M.** (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, **18**, 878–884.
- Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M., et Bergenstahl, B.** (2000). An aqueous polymer two-phase system as carrier in the spray-drying of biological material. *Journal of colloid and interface science*, **225**, 54–61.
- Mitra, S., Chakrabarty, P. K., et Biswas, S. R.** (2005). Production and characterization of nisin-like peptide produced by a strain of *Lactococcus lactis* isolated from fermented milk. *Current microbiology*, **51**, 183–187.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Tassinari Ortolani, M. B., Yamazi, A. K., Viccosa, G. N., et Nero, L. A.** (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT-Food Science and Technology*, **43**, 1320–1324.
- Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., et Lavoie, M. C.** (2001). Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian journal of microbiology*, **47**, 322–331.
- Moreno, I., Lerayer, A. L. S., Baldini, V. L. S., et Leitão, M. F. F.** (2000). Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, **31**, 183–191.
- Moreno, Y., Collado, M. C., Ferrús, M. A., Cobo, J. M., Hernández, E., et Hernández, M.** (2006). Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts. *International journal of food science & technology*, **41**, 275–280.
- Morris, E. R., Rees, D. A., Thom, D., et Boyd, J.** (1978). Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydrate research*, **66**, 145–154.
- Morris, V. J.** (1985). Food gels-roles played by polysaccharides. *Chemistry and Industry*, 159-164.
- Mota-Meira, M., Lapointe, G., Lacroix, C., et Lavoie, M. C.** (2000). MICs of Mutacin B-Ny266, Nisin A, Vancomycin, and Oxacillin against Bacterial Pathogens. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **44**, 24-29.
- Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R., et Chikindas, M. L.** (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*, **44**, 255–261.
- Musampa, R. M., Alves, M. M., et Maia, J. M.** (2007). Phase separation, rheology and microstructure of pea protein–kappa-carrageenan mixtures. *Food hydrocolloids*, **21**, 92–99.

N

- Nag, A., Han, K.-S., et Singh, H.** (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, **21**, 247–253.
- Najjar, M. Z. B., Chikindas, M. L., et Montville, T. J.** (2009). The Acid Tolerance Response Alters Membrane Fluidity and Induces Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **1**, 130-135.
- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H., Joerger, R. D., Hicks, D. T., et Hoover, D. G.** (2008). Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. *International journal of food microbiology*, **122**, 8–15.
- Nelson, K. E., Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Ravel, J., DeBoy, R. T., Kolonay, J. F., Rasko, D. A., Angiuoli, S. V., Gill, S. R., et Paulsen, I. T.** (2004). Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic acids research*, **32**, 2386–2395.
- Neunlist, M. R., Ralazamahaleo, M., Cappelier, J.-M., Besnard, V., Federighi, M., et Leroi, F.** (2005). Effect of Salting and Cold-Smoking Process on the Culturability, Viability, and Virulence of *Listeria monocytogenes* Strain Scott A. *Journal of Food Protection*, **68**, 85-91.
- 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.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L., Sletten, K., et Nes, I.** (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of bacteriology*, **174**, 5686.
- Nissen-Meyer, J., Oppegaard, C., Rogne, P., Haugen, H. S., et Kristiansen, P. E.** (2010). Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **2**, 52–60.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H. S., et Kristiansen, P. E.** (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current pharmaceutical biotechnology*, **10**, 19–37.
- Nono, M., Lalouette, L., Durand, D., et Nicolai, T.** (2011). Cluster formation and phase separation in mixtures of sodium κ -carrageenan and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, **25**, 743-749.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., et Panyim, S.** (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International journal of food microbiology*, **81**, 137–145.
- Norton, I. T. et Frith, W. J.** (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, **15**, 543-553.

O

- O'Driscoll, B., Gahan, C. G., et Hill, C.** (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1693–1698.
- 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*

varians, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *Journal of applied microbiology*, **90**, 106–114.

O'Sullivan, L., O'connor, E. B., Ross, R. P., et Hill, C. (2006). Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of applied microbiology*, **100**, 135–143.

Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J., et Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in applied microbiology*, **37**, 448–451.

Oscariz, J. C. et Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*, **4**, 13–19.

P

Pacek, A. W., Ding, P., Nienow, A. W., et Wedd, M. (2000). Phase separation and drop size distributions in « homogeneous » Na-alginate/Na-caseinate mixtures. *Carbohydrate polymers*, **42**, 401–409.

Paddock, S. W. (2000). Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Molecular biotechnology*, **16**, 127–149.

Palmer, J., Flint, S., et Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **34**, 577–588.

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., et Kosseva, M. R. (2007). Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L (+) lactic acid production from whey. *Applied microbiology and biotechnology*, **74**, 35–42.

Papagianni, M., Avramidis, N., et Filioussis, G. (2007). Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1557–1563.

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

Pei, J., Yuan, Y., et Yue, T. (2013). Primary characterization of bacteriocin paracin C – A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*. *Food Control*, **34**, 168–176.

Pereira, T., Millar, T. J., et Chuck, J.-A. (2005). Viability analysis of alginate encapsulated microorganisms using fluorescent stains. *Journal of microencapsulation*, **22**, 787–792.

Perrechil, F. A. et Cunha, R. L. (2012). Development of multiple emulsions based on the repulsive interaction between sodium caseinate and LBG. *Food Hydrocolloids*, **26**, 126–134.

Petrovic, T., Nedovic, V., Dimitrijevic-Brankovic, S., Bugarski, B., et Lacroix, C. (2007). Protection of probiotic microorganisms by microencapsulation. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, **13**, 169–174.

Picot, A. et Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, **14**, 505–515.

Planas, J., Radström, P., Tjerneld, F., et Hahn-Hägerdal, B. (1996). Enhanced production of lactic acid through the use of a novel aqueous two-phase system as an extractive fermentation system. *Applied microbiology and biotechnology*, **45**, 737–743.

Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., et Dicks, L. M. T. (2007). Characterization of

bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, **17**, 190–198.

Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., et Rangsiruji, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, **23**, 547–551.

R

Ramos, Ó., Santos, A., Leão, M., Pereira, J., Silva, S. B., Fernandes, J., Franco, I., Pintado, M. E., et Malcata, F. X. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*, **25**, 132–141.

Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J.-C., et Bouix, M. (2007). Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, **55**, 35–43.

Razavi Rohani, S. M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S. S., et Griffiths, M. W. (2011). The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 2260–2265.

Rediguieri, C. F., de Freitas, O., Lettinga, M. P., et Tuinier, R. (2007). Thermodynamic incompatibility and complex formation in pectin/caseinate mixtures. *Biomacromolecules*, **8**, 3345–3354.

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.

Rhim, J.-W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food Science and Technology*, **37**, 323–330.

Richard, J. (1996). Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs: mythe ou réalité? *Le Lait*, **76**, 179–189.

Rito-Palomares, M., Negrete, A., Galindo, E., et Serrano-Carreón, L. (2000). Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **743**, 403–408.

Rito-Palomares, M., Negrete, A., Miranda, L., Flores, C., Galindo, E., et Serrano-Carreón, L. (2001). The potential application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl- δ -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and microbial technology*, **28**, 625–631.

Roberts, S. A., Kasapis, S., et De Santos López, I. (2000). Textural properties of a model aqueous phase in low fat products. Part I: Alginate, caseinate and starch in isolation, and in starch containing binary mixtures. *International journal of food science & technology*, **35**, 215–226.

Rocourt, J. (1991). Human listeriosis-1989. *World Health Organization*.

Rocourt, J. et Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. *ASM Press, Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*.

Rodgers, S. (2008). Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. *Trends in Food Science and Technology*, **19**, 188–197.

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.

- Rodriguez, J., Cintas, L., Casaus, P., Suarez, A., et Hernandez, P.** (1995). PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2802-2805.
- Rodriguez, J. M., Martinez, M. I., et Kok, J.** (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*, **42**, 91–121.
- Romanova, N., Favrin, S., et Griffiths, M. W.** (2002). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to Sanitizers Used in the Meat Processing Industry. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 6405-6409.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., et Rosenberg, E.** (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *Federation of European Biochemical Societies Microbiology Letters*, **9**, 29-33.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., et Ross, R. P.** (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 612–619.
- Ryser, E. T. et Marth, E. H.** (2007). *Listeria*, listeriosis, and food safety. *CRC*.

S

- Salminen, S. et Von Wright, A.** (2009). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Third Edition Taylor & Francis*.
- Sanchez-Gonzalez, L., Ivan, J., Saavedra, Q., et Chiralt, A.** (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, **33**, 92-98.
- Sant’Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., et Franco, B. D. G. M.** (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, **157**, 52-58.
- Savijoki, K., Ingmer, H., et Varmanen, P.** (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **71**, 394-406.
- Scannell, A. G., Hill, C., Ross, R. ., Marx, S., Hartmeier, W., et Arendt, E. K.** (2000a). Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin®. *International Journal of Food Microbiology*, **60**, 241-249.
- Scannell, A. G. M., Hill, C., Ross, R. P., Marx, S., Hartmeier, W., et Arendt, E. K.** (2000b). Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. *Journal of applied microbiology*, **89**, 573–579.
- Schägger, H.** (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, **1**, 16–22.
- Schägger, H. et Von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, **166**, 368.
- Schär-Zammaretti, P. et Ubbink, J.** (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical journal*, **85**, 4076–4092.
- Schillinger, U., Geisen, R., et Holzapfel, W. H.** (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*, **7**, 158–164.

- Schorsch, C., Jones, M. G., et Norton, I. T.** (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, **13**, 89–99.
- Schuck, P., Dolivet, A., et Jeantet, R.** (2012). Les poudres laitières et alimentaires: Techniques d'analyse. *Tec & Doc Lavoisier*.
- Schütz, H. et Radler, F.** (1984). Propanediol-1, 2-dehydratase and metabolism of glycerol of *Lactobacillus brevis*. *Archives of microbiology*, **139**, 366–370.
- Schwarz-Linek, J., Dorken, G., Winkler, A., Wilson, L. G., Pham, N. T., French, C. E., Schilling, T., et Poon, W. C. K.** (2010). Polymer-induced phase separation in suspensions of bacteria. *Europhysics Letters*, **89**, 68003.
- Sebti, I., Blanc, D., Carnet-Ripoche, A., Saurel, R., et Coma, V.** (2004). Experimental study and modeling of nisin diffusion in agarose gels. *Journal of Food Engineering*, **63**, 185-190.
- Serrazanetti, D. I., Guerzoni, M. E., Corsetti, A., et Vogel, R.** (2009). Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiology*, **26**, 700-711.
- 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.
- Sharma, S., Garg, A. P., et Singh, G.** (2010). Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CCSULAC1 on modified MRS medium. *International Journal of Dairy Science*, **5**, 1–9.
- Shi, Z., Wei, P., Zhu, X., Cai, J., Huang, L., et Xu, Z.** (2012). Efficient production of l-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, **51**, 263-268.
- Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M., et Adachi, S.** (2006). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food hydrocolloids*, **20**, 1164–1169.
- Siew, C. K., Williams, P. A., et Young, N. W.** (2005). New insights into the mechanism of gelation of alginate and pectin: Charge annihilation and reversal mechanism. *Biomacromolecules*, **6**, 963–969.
- Simeone, M., Alfani, A., et Guido, S.** (2004). Phase diagram, rheology and interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate. *Food hydrocolloids*, **18**, 463–470.
- Simeone, M., Molè, F., et Guido, S.** (2002). Measurement of average drop size in aqueous mixtures of Na-alginate and Na-caseinate by linear oscillatory tests. *Food hydrocolloids*, **16**, 449–459.
- Snappe, J.-J., Lepoudère, A., et Sredzinski, N.** (2010). Protéines laitières. *Dossier Techniques de l'Ingénieur*.
- Sodini, I., Boquien, C.-Y., Corrieu, G., et Lacroix, C.** (1997). Microbial dynamics of co- and separately entrapped mixed cultures of mesophilic lactic acid bacteria during the continuous prefermentation of milk. *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 381-388.
- Soma, P. K., Williams, P. D., et Lo, Y. M.** (2009). Advancements in non-starch polysaccharides research for frozen foods and microencapsulation of probiotics. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, **3**, 413–426.
- Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N., et Ishizaki, A.** (2000). Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, 325–334.

Sosa-Herrera, M. G., Lozano, I. E., Ponce de León, Y. R., et Martínez-Padilla, L. P. (2012). Effect of added calcium chloride on the physicochemical and rheological properties of aqueous mixtures of sodium caseinate/sodium alginate and respective oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, **29**, 175-184.

Srinivasan, M., Singh, H., et Munro, P. A. (2002). Formation and stability of sodium caseinate emulsions: influence of retorting (121°C for 15 min) before or after emulsification. *Food Hydrocolloids*, **16**, 153-160.

Steen, M. T., Chung, Y. J., et Hansen, J. N. (1991). Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Applied and environmental microbiology*, **57**, 1181–1188.

Stoppel, W. L., White, J. C., Horava, S. D., Bhatia, S. R., et Roberts, S. C. (2011). Transport of biological molecules in surfactant–alginate composite hydrogels. *Acta biomaterialia*, **7**, 3988–3998.

Stoyanova, L. G. et Levina, N. A. (2006). Components of fermentation medium regulate bacteriocin synthesis by the recombinant strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116. *Microbiology*, **75**, 286–291.

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.

T

Tagg, J. R. et Wannamaker, L. W. (1978). Streptococcin A-FF22: Nisin-Like Antibiotic Substance Produced by a Group A *Streptococcus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **14**, 36-39.

Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C., et Fliss, I. (2009). Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food microbiology*, **26**, 783–793.

Tang, J. S. et Gillevet, P. M. (2003). Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **53**, 995–997.

Tashiro, Y., Kaneko, W., Sun, Y., Shibata, K., Inokuma, K., Zendo, T., et Sonomoto, K. (2011). Continuous d-lactic acid production by a novelthermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**, 1741-1750.

Terzaghi, B. E. et Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied microbiology*, **29**, 807–813.

Thomas, L. V. et Wimpenny, J. W. (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology*, **62**, 2006–2012.

Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P., et Skj\aaak-Bræk, G. (1996). Alginate polycation microcapsules: I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, **17**, 1031–1040.

Thu, B., Gaaserød, O., Paus, D., Mikkelsen, A., Skj\aaak-Bræk, G., Toffanin, R., Vittur, F., et Rizzo, R. (2000). Inhomogeneous alginate gel spheres: An assessment of the polymer gradients by synchrotron radiation-induced x-ray emission, magnetic resonance micro-imaging, and mathematical modeling. *Biopolymers*, **53**, 60–71.

Todorov, S. D. et Dicks, L. M. T. (2006). Effect of medium components on bacteriocin production

by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Research*, **161**, 102–108.

Todorov, S. D. et Dicks, L. M. T. (2004). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of Basic Microbiology*, **44**, 305–316.

Todorov, S. D., Prevost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., et Franco, B. D. G. M. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)-from isolation to application: 1. Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, **44**, 1351–1363.

Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, **17**, 1–23.

Tolstoguzov, V. B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, **4**, 429–468.

Tolstoguzov, V. B. (1995). Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*, **9**, 317–332.

Tomas, M. S. J., Bru, E., et Nader-Macias, M. E. (2003). Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **188**, 35–44.

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

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., et Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **123**, 50–60.

Tuinier, R., Vliegthart, G. A., et Lekkerkerker, H. N. (2000). Depletion interaction between spheres immersed in a solution of ideal polymer chains. *The Journal of Chemical Physics*, **113**, 10768–10775.

Turgeon, S. L., Beaulieu, M., Schmitt, C., et Sanchez, C. (2003). Protein–polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current opinion in colloid and interface science*, **8**, 401–414.

U

Ukuku, D. O. et Shelef, L. A. (1997). Sensitivity of Six Strains of *Listeria monocytogenes* to Nisin. *Journal of Food Protection*, **60**, 867–869.

Umakoshi, H., Kuboi, R., et Komasa, I. (1997). Control of partitioning of bacterial cells and characterization of their surface properties in aqueous two-phase systems. *Journal of fermentation and bioengineering*, **84**, 572–578.

V

Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of applied microbiology*, **91**, 147–153.

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.

Van Puyvelde, P., Velankar, S., et Moldenaers, P. (2001). Rheology and morphology of compatibilized polymer blends. *Current opinion in colloid and interface science*, **6**, 457–463.

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.

Vrij, A. (1976). Polymers at interfaces and the interactions in colloidal dispersions. *Pure and Applied Chemistry*, **48**, 471.

W

Wadhawan, T., Maruska, Z. B., Siripattanakul, S., Hill, C. B., Gupta, A., Prüß, B. M., McEvoy, J. M., et Khan, E. (2011). A new method to determine initial viability of entrapped cells using fluorescent nucleic acid staining. *Bioresource technology*, **102**, 1622–1627.

Waters, C. M. et Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, **21**, 319–346.

Wessels, S. et Huss, H. H. (1996). Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food microbiology*, **13**, 323–332.

Wijaya, A., Neudeker, C., Holzappel, W., et Franz, C. (2006). Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. *Proceedings of Food Microbiology, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy*, **124**.

Wright, P. J., Ciampi, E., Hoad, C. L., Weaver, A. C., van Ginkel, M., Marciani, L., Gowland, P., Butler, M. F., et Rayment, P. (2009). Investigation of alginate gel inhomogeneity in simulated gastro-intestinal conditions using magnetic resonance imaging and transmission electron microscopy. *Carbohydrate Polymers*, **77**, 306–315.

X

Xiao, D., Davidson, P. M., et Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 1977-1985.

Y

Yang, R., Johnson, M. C., et Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3355–3359.

Yildirim, Z., Avsar, Y. K., et Yildirim, M. (2002). Factors affecting the adsorption of bacteriocin LB, a bacteriocin produced by *Lactocobacillus buchneri*. *Microbiological research*, **157**, 103–107.

Z

Zactiti, E. M. et Kieckbusch, T. G. (2006). Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of food engineering*, **77**, 462–467.

Zasytkin, D. V., Braudo, E. E., et Tolstoguzov, V. B. (1997). Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, **11**, 159-170.

- Zendo, T., Yoneyama, F., et Sonomoto, K.** (2010). Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Applied microbiology and biotechnology*, **88**, 1–9.
- Zhang, Y., LIU, Y., BAO, Y., et ZHANG, H.** (2010). Influence of pH, Heat and Enzymatic Treatments on the Activity of Antibacterial Substance in MRS and Milk Media Produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agricultural Sciences in China*, **9**, 911-920.
- Zhou, H., Fang, J., Tian, Y., et Lu, X. Y.** (2013). Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Annals of Microbiology*, 1-8.
- Zotta, T., Parente, E., et Ricciardi, A.** (2009). Viability staining and detection of metabolic activity of sourdough lactic acid bacteria under stress conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 1119–1124.

Annexe 1. Composition des milieux de culture

(informations fournies par Biokar Diagnostics, France)

Bouillon MRS (« De Man, Rogosa, Sharpe »)

Domaine d'utilisation

Le bouillon MRS est utilisé pour les cultures et dénombrements des lactobacilles dans les produits alimentaires. A partir de colonies isolées, il est possible de réaliser de luxuriantes subcultures. Le milieu permet également de cultiver les lactobacilles à croissance ralentie tels que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum*.

Composition

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone.....	10,00 g
- Extrait de viande.....	10,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Glucose.....	20,00 g
- Tween 80.....	1,08 g
- Phosphate dipotassique.....	2,00 g
- Acétate de sodium.....	5,00 g
- Citrate d'ammonium.....	2,00 g
- Sulfate de magnésium.....	0,20 g
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,4 ± 0,2.

Préparation

- Mettre en solution 55,3 g de milieu déshydraté (BK070) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète, en chauffant si nécessaire.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conservation

- Milieu déshydraté : 2-20°C.
- Milieu préparé en tubes ou en flacons : 6 mois à 2-8°C.

N.B. : Le bouillon MRS modifié a été préparé en supprimant de la composition l'acétate de sodium et le phosphate dipotassique.

Gélose MRS

Domaine d'utilisation

La gélose MRS est utilisée pour la culture et le dénombrement des *Lactobacillus* dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires ainsi que dans les produits destinés à l'alimentation animale. Ce milieu permet de cultiver des germes à croissance ralentie tels que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum*. Acidifié à pH 5,4, il permet également de dénombrer *Lactobacillus bulgaricus* dans les yaourts. Dans le cadre des analyses des produits destinés à l'alimentation humaine et animale, la gélose MRS doit être utilisée aux pH préconisés par les normes en vigueur.

Composition

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone.....	10,00 g
- Extrait de viande.....	10,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Glucose.....	20,00 g
- Tween 80.....	1,08 g
- Phosphate dipotassique.....	2,00 g
- Acétate de sodium.....	5,00 g
- Citrate d'ammonium.....	2,00 g
- Sulfate de magnésium.....	0,20 g
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g
- Agar agar bactériologique.....	15,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 5,7 ± 0,1.

Préparation

- Mettre en suspension 70,3 g de milieu déshydraté (BK089) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- Refroidir et maintenir le milieu à 47°C pour utilisation.

Conservation

- Milieu déshydraté : 2-20°C.
- Milieu préparé en flacons : 6 mois à 2-8°C.

Bouillon M17

Domaine d'utilisation

Le bouillon M17 a été mis au point pour les cultures et dénombrement des lactocoques dans le lait et les produits laitiers. Il favorise la culture des mutants incapables de fermenter le lactose. Il est bien adapté à la culture de *Lactococcus lactis* qui est un microorganisme particulièrement exigeant. Les peptones de caséine, de viande et de soja contiennent les sources de carbone et d'azote nécessaires à la culture des lactocoques. L'extrait de levure est une source de vitamines du groupe B. L'acide ascorbique agit comme stimulateur de croissance. Le lactose est fermenté en acide lactique. Celui-ci est progressivement neutralisé par le glycérophosphate de sodium afin que soit stabilisé le pH du milieu.

Composition

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	2,50 g
- Extrait de viande.....	5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
- Peptone pepsique de viande.....	2,50 g
- Peptone papaïnique de soja.....	5,00 g
- Lactose.....	5,00 g
- Glycérophosphate de sodium.....	19,00 g
- Acide ascorbique.....	0,50 g
- Sulfate de magnésium.....	0,25 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

Préparation

- Mettre en suspension 42,2 g de milieu déshydraté (BK012) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète, en chauffant si nécessaire.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conservation

- Milieu déshydraté : 2-20°C.
- Milieu préparé en flacons : 6 mois à 2-8°C.

Bouillon TSB (« Tryptone Soja Broth »)

Domaine d'utilisation

Le milieu TSB est un milieu nutritif universel utilisé dans de nombreux cas. Il peut être utilisé pour la croissance et l'isolation de nombreuses bactéries en aérobiose et en anaérobiose.

Composition

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	17,0 g
- Peptone papainique de soja.....	3,0 g
- Glucose.....	2,5 g
- Phosphate dipotassique.....	2,5 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

Préparation

- Mettre en solution 30,0 g de milieu déshydraté (BK046) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète..
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conservation

- Milieu déshydraté : 2-30°C.
- Milieu préparé en tubes ou en flacons : 6 mois à 2-25°C.

Gélose TSA (« Tryptone Soja Agar »)

Domaine d'utilisation

Le milieu TSA est un milieu nutritif universel utilisé dans de nombreux cas. Il peut être utilisé pour la croissance et l'isolation de nombreuses bactéries en aérobiose et en anaérobiose.

Composition

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	15,0 g
- Peptone papainique de soja.....	5,0 g
- Chlorure de sodium.....	8,5 g
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

Préparation

- Mettre en suspension 40,0 g de milieu déshydraté (BK047) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- Refroidir et maintenir le milieu à 47°C pour utilisation.

Conservation

- Milieu déshydraté : 2-30°C.
- Milieu préparé en flacons : 6 mois à 2-25°C.
- Milieu coulé en boîtes : 1 mois à 2-8°C.

Milieu TS (« Tryptone Salt »)

Domaine d'utilisation

Le bouillon TS est un diluant destiné à la préparation des suspensions mères de laits en poudre et concentrés, de produits laitiers et d'autres produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique.

Il est également utilisé pour effectuer les dilutions décimales.

Composition

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	1,0 g
- Chlorure de sodium.....	8,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

Préparation

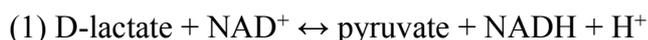
- Mettre en solution 9,5 g de milieu déshydraté (BK014) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conservation

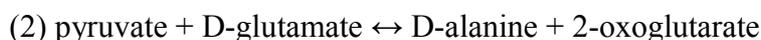
- Refroidir à 25°C.
- Préparation de dilutions décimales : introduire 1 mL de suspension mère dans un tube contenant 9 mL de milieu ainsi préparé, homogénéiser parfaitement, recommencer l'opération jusqu'à l'obtention de la dilution souhaitée.

Annexe 2. Principe du dosage de l'acide lactique_Kit Megazyme D-lactic acid and L-lactic acid (K-DLATE)

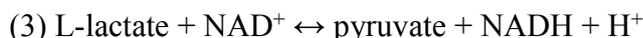
Les réactions mises en œuvre lors de ce dosage sont des réactions enzymatiques. L'acide D-lactique et l'acide L-lactique sont dosés successivement. La première réaction est catalysée par la D-lactate déshydrogénase (D-LDH), l'acide D-lactique est oxydé en pyruvate en présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) (1).



Cependant, l'équilibre de la réaction est fermement en faveur de l'acide D-lactique et de NAD⁺, une réaction supplémentaire est nécessaire pour piéger le produit pyruvate. Celle-ci est réalisée par la conversion de pyruvate en D-alanine et 2-oxoglutarate avec l'enzyme D-glutamate-pyruvate transaminase (D-GPT) en présence d'un excès de D-glutamate (2).



La quantité de NADH formée dans la réaction ci-dessus est stoechiométriquement couplée à la quantité d'acide D-lactique. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm. Dans un ensemble de réactions similaire, l'acide L-lactique est oxydé en pyruvate par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) en présence de NAD⁺ (3).



Le pyruvate est à nouveau piégé à l'aide de D-GPT en présence d'un excès important de D-glutamate.

Procédure de dosage séquentiel de l'acide D- et L-lactique selon le kit Megazyme.

Longueur d'onde de mesure : 340 nm	
Température ambiante	
Lecture contre l'air	
Dans une macrocuve,	
Eau distillée	1,50 mL
Échantillon	0,10 mL
Solution 1 (tampon)	0,50 mL
Solution 2 (NAD ⁺)	0,10 mL
Suspension 3 (D-GPT)	0,02 mL
Mélanger, après 3 min, lecture de l'absorbance A1 (elle doit être stable, si elle évolue, attendre quelques minutes supplémentaires)	
Suspension 5 (D-LDH)	0,02 mL
Mélanger, après 5 min, lecture de l'absorbance A2 (elle doit être stable, si elle évolue, attendre quelques minutes supplémentaires)	
Suspension 4 (L-LDH)	0,02 mL
Mélanger, après 10 min, lecture de l'absorbance A3 (elle doit être stable, si elle évolue, attendre quelques minutes supplémentaires)	

Pour obtenir la concentration en acide lactique (D et L) en g.L-1 présente dans l'échantillon, les calculs sont les suivants.

$$c = \frac{(V * MW)}{(\epsilon * d * v)} * \Delta A$$

avec c : concentration en g.L-1

V : volume final dans la cuve (mL)

MW : poids moléculaire

ϵ : coefficient d'extinction de NADH à 340 nm (= 630 L.mol⁻¹.cm⁻¹)

d : trajet de la lumière (cm)

v : volume de l'échantillon (mL)

ΔA : pour l'acide lactique D $\rightarrow \Delta A_{\text{acide D-lactique}} = A2 - A1$,

pour l'acide lactique L $\rightarrow \Delta A_{\text{acide L-lactique}} = A3 - A2$.

Ce qui donne donc pour l'acide D-lactique :

$$c = \frac{(2,24 * 90,1)}{(6300 * 1,0 * 0,1)} * \Delta A(\text{acide D-lactique}) = 0,3204 * \Delta A(\text{acide D-lactique})$$

et pour l'acide L-lactique :

$$c = \frac{(2,26 * 90,1)}{(6300 * 1,0 * 0,1)} * \Delta A(\text{acide L-lactique}) = 0,3232 * \Delta A(\text{acide L-lactique})$$

Annexe 3. Électrophorèse Tricine-Page Protocole détaillé

L'électrophorèse Tricine-SDS-page est communément utilisé pour la séparation des peptides de masse moléculaire allant de 1 à 100 kDa nous permettant pour ce projet de détecter la présence de bactériocines dans les surnageants de culture de LAB. Ce protocole a été mis au point au sein de BioDyMIA à partir de deux publications de Schägger (Schägger et Von Jagow, 1987 ; Schägger, 2006).

Les différentes solutions mères ont été préparées comme suit :

A. Tampon de charge 2X

- Dissoudre 1 g de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, L3771, Sigma) à chaud (~70°C) dans 60 à 70 mL d'eau distillée
- Ajouter : 1,21 g de Tris (T1503, Sigma), 0,2 g de Serva Blue® (Serva), 4 mL de mercaptoéthanol (M7154, Sigma) et 24 g de glycérol (Labogros, France)
- Mesurer le pH et ajuster à 6,8 (avec HCl)
- Transvaser en fiole jaugée de 100 mL et compléter avec de l'eau distillée

B. Acrylamide 49,5 % (m/v) T – 3 % (m/v) C

- Peser 24 g d'acrylamide (A3553, Sigma), 0,75 g de bis-acrylamide (146072, Sigma) et ajouter progressivement 40 mL d'eau sous agitation et en chauffant légèrement
- Transvaser en fiole jaugée de 50 mL et compléter avec de l'eau distillée

C. Acrylamide 49,5 % (m/v) T – 6 % (m/v) C

- Peser 23,25 g d'acrylamide, 1,50 g de bis-acrylamide et ajouter progressivement 40 mL d'eau sous agitation et en chauffant légèrement
- Transvaser en fiole jaugée de 50 mL et compléter avec de l'eau distillée

D. Tampon pour gel : solution à 0,3 % (m/v) SDS, Tris 3 M, pH 8,45

- Dissoudre 0,6 g de SDS à chaud (~70°C) dans 20 mL d'eau distillée
- Ajouter 72,6 g de Tris et ~160 mL d'eau distillée
- Mesurer le pH et ajuster à 8,45 (avec HCl)
- Transvaser en fiole jaugée de 200 mL et compléter avec de l'eau distillée

E. Persulfate d'ammonium 10 % (m/v)

- Peser 2 g de persulfate d'ammonium (A3678, Sigma)
- Transvaser en fiole jaugée de 20 mL et compléter avec de l'eau distillée

F. Tampon cathode, 0,1 % (m/v) SDS, Tris 0,1 M, Tricine 0,1 M, pH 8,25

- Dissoudre 0,5 g de SDS à chaud (~70°C) dans 20 mL d'eau distillée
- Ajouter 6,05 g de Tris, 8,96 g de Tricine (T0377, Sigma) et ~400 mL d'eau distillée
- Mesurer le pH et ajuster à 8,25 (avec HCl ou NaOH)
- Transvaser en fiole jaugée de 500 mL et compléter avec de l'eau distillée

G. Tampon anode, Tris 0,2 M, pH 8,9

- Dissoudre 24,23 g de Tris dans de l'eau distillée (~800 mL)

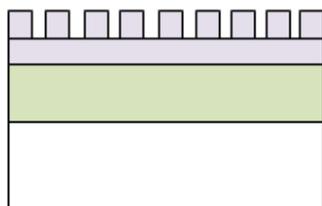
- Mesurer le pH et ajuster à 8,9 (avec HCl)
- Transvaser en fiole jaugée de 1000 mL et compléter avec de l'eau distillée

Trois gels différents doivent être coulés successivement les uns par dessus les autres. Un gabarit, à fixer sur la plaque de verre, indique les hauteurs à couler.

Composition des gels (TEMED : T9281, Sigma)

	Quantités pour 1 plaque avec espaceurs et peignes 1 mm (utiliser la plaque pleine au 2e emplacement)			Quantités pour 2 plaques avec espaceurs et peignes 1 mm		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 1	Gel 2	Gel 3
Glycérol	4 g	-	-	8 g	-	-
Acrylamide 49,5%T- 3%C ¹	-	1,5 mL	0,5 mL	-	3 mL	1 mL
Acrylamide 49,5%T- 6%C ¹	10 mL	-	-	20 mL	-	-
Tampon pour gel	10 mL	2,5 mL	1,5 mL	20 mL	5 mL	3,1 mL
Eau distillée	6 mL	3,5 mL	4,25 mL	12 mL	7 mL	8,4 mL
Mélanger, puis ajouter au dernier moment :						
Persulfate d'ammonium 10 %	100 µL	100 µL	100 µL	200 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	12,5 µL	20 µL	10 µL	12,5 µL

Coulage des gels



gel 3 : gel de concentration « stacking gel » : 4 cm ; 4 %T, 3 % C (4,8 mL)

gel 2 : gel d'espacement « spacer gel » : 2 cm ; 10 %T, 3 % C (4,8 mL)

gel 1 : gel de séparation « separating gel » : 14 cm ; 16,5 %T, 6 % C (22,4 mL)

Le premier gel est coulé rapidement sans faire de bulles. Une fine couche d'eau est déposée à la surface et le gel est laissé pour polymérisation environ 30 min en vérifiant la prise du restant du gel dans le bécher. Une fois le premier gel polymérisé, la fine couche d'eau est enlevée à l'aide de papier absorbant et le second gel est coulé en suivant la même méthodologie. Pour le gel n°3, le peigne doit être placé avant de couler le gel.

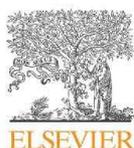
Les échantillons sont ajoutés au tampon de charge en proportion 50/50 (v/v). Les volumes des dépôts dans les puits sont compris entre 10 et 40 µL. La migration se fait selon le programme suivant (générateur Bio-Rad, Power Pac™, Universal, 500 V, 2,5 A, 500 W) :

- Étape 1 : 30 V, limites 100 mA/500 W, durée 1h
- Étape 2 : 7 W, limites 300 V/250 mA, durée environ 18 h.

A la fin de la migration, le gel est récupéré délicatement et révélé. Une première étape de pré-fixation est réalisée avec un bain d'une heure dans une solution de glutaraldéhyde (G6257, Sigma) à 5 %. Le gel est ensuite rincé dans l'eau distillée et placé dans un bain avec la solution de fixation (acide acétique (33209, Sigma)/méthanol (65543, Sigma)/eau distillée (10/50/40)) pendant 30 min. Puis le gel est coloré 1 h dans une solution de Serva Blue® à 0,025 % (m/v) dans de l'acide acétique à 10 % (v/v). Enfin la décoloration se réalise en plusieurs bains (de 30 min au début à 2h à la fin) de solution d'acide acétique à 10 % (v/v) jusqu'à obtenir un fond clair et des bandes nettes.

Annexe 4. Publication 1 dans Colloids and Surfaces B: Biointerfaces « Preferential localization of *Lactococcus lactis* cells entrapped in a caseinate/alginate phase separated system »

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 109 (2013) 266–272



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Preferential localization of *Lactococcus lactis* cells entrapped in a caseinate/alginate phase separated system



Lucie Léonard^{a,b}, Adem Gharsallaoui^a, Fahima Ouaali^a, Pascal Degraeve^a, Yves Waché^b, Rémi Saurel^b, Nadia Oulahal^{a,*}

^a Université de Lyon, Université Lyon 1, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil Université Lyon 1 – ISARA Lyon n° 3733, Technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France

^b UMR PAM, Agrosup Dijon, Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2012

Received in revised form 6 March 2013

Accepted 11 March 2013

Available online xxx

Keywords:

Lactococcus lactis

Bacterial cells entrapment

Aqueous two-phase system

Phase diagram

Sodium caseinate

Sodium alginate

ABSTRACT

This study aimed to entrap bioprotective lactic acid bacteria in a sodium caseinate/sodium alginate aqueous two-phase system. Phase diagram at pH = 7 showed that sodium alginate and sodium caseinate were not miscible when their concentrations exceeded 1% (w/w) and 6% (w/w), respectively. The stability of the caseinate/alginate two-phase system was also checked at pH values of 6.0 and 5.5. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LAB3 cells were added in a 4% (w/w) caseinate/1.5% (w/w) alginate two-phase system at pH = 7. Fluorescence microscopy allowed to observe that the caseinate-rich phase formed droplets dispersed in a continuous alginate-rich phase. The distribution of bacteria in such a system was observed by epifluorescence microscopy: *Lc. lactis* LAB3 cells stained with Live/Dead[®] BacLight kit[™] were located exclusively in the protein phase. Since zeta-potential measurements indicated that alginate, caseinate and bacterial cells all had an overall negative charge at pH 7, the preferential adhesion of LAB cells was assumed to be driven by hydrophobic effect or by depletion phenomena in such biopolymeric systems. Moreover, LAB cells viability was significantly higher in the ternary mixture obtained in the presence of both caseinate and alginate than in single alginate solution. Caseinate/alginate phase separated systems appeared thus well suited for *Lc. lactis* LAB3 cells entrapment.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Food fermentation is one of the oldest techniques of food preservation. Its efficiency is based on various mechanisms by which microorganisms can inhibit the growth of food spoilage or food-borne pathogenic microorganisms (e.g. competition for nutrients and production of antimicrobial metabolites). The exploitation of these mechanisms for the preservation of non-fermented foods namely includes the direct addition of preservatives of microbial origin such as organic acids (e.g. lactic or propionic acid) and other more specific antimicrobial molecules such as nisin. Encapsulation or incorporation in food packaging materials have been proposed to increase their efficiency and/or to control their release in food matrices.

In the last decade, the exploitation of bioprotective microorganisms to increase microbial safety and/or shelf life of foods has also been proposed as an economic and efficient alternative to the addition of food preservatives. As in traditional fermented products, most of these bioprotective microorganisms are lactic acid bacteria (LAB). A good example of their application is their spraying on the

surface of cooked shrimps which results in a shelf life at least as long as with artificial preservatives [1]. As pointed out in several recent articles, the entrapment of bioprotective LAB in polymers could render their storage and handling more convenient. LAB cells entrapped in calcium alginate beads and subsequently freeze-dried were stored at 4 °C for 6 months; their viability and antimicrobial activity remained stable [2]. Cells of bacterial strains selected for their anti-listerial activity were incorporated in caseinate [3], starch and alginate [4] or polyvinyl alcohol (PVOH) [5]. Once put in direct contact with foods artificially contaminated with *Listeria monocytogenes*, they effectively inhibited its growth. Antimicrobial matrices containing bioprotective bacteria can thus be considered as a promising alternative to food preservatives presenting several advantages. (i) From an economic perspective, the incorporation of cells rather than antimicrobial metabolites is less expensive. (ii) In addition to their effectiveness during refrigerated storage, the growth of bioprotective bacteria and their production of antimicrobial metabolites are activated when temperature is increasing, such as when an accidental rise of temperature occurs during food storage. They can thus be considered as active packaging. Incorporation of bioprotective microorganisms in matrices varying in composition and structure could be an innovative strategy to provide a microenvironment that would favour the preservation of their viability and their antimicrobial activity.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 74 45 52 52; fax: +33 4 74 45 52 53.
E-mail address: nadia.oulahal@univ-lyon1.fr (N. Oulahal).

Indeed, there is a growing interest in the development of biopolymer-based delivery systems to encapsulate, protect and release active substances [6]. Proteins/polysaccharides mixtures have been proposed to formulate such bioprotective systems. Several structures could be observed with these mixtures depending on the interactions between proteins and polysaccharides. The most common example of this type of interaction is the electrostatic attraction between two biopolymers carrying opposite electrical charges resulting in molecular complexes. If these complexes are soluble, biopolymers and solvent are in the same phase; otherwise biopolymers complexes are concentrated in one of two phases, the other containing mainly solvent. This situation is called complex coacervation or associative phase separation [7,8]. However, when biopolymer–solvent interactions are favoured and at high concentrations in biopolymers, both phases contain preferably one biopolymer, the solvent being divided between both phases. This type of phase separation is called segregative phase separation and is governed by thermodynamic incompatibility [7–9]. It is a spontaneous phase separation caused by a net repulsion between the biopolymers in aqueous solution, each having a preferential affinity with the solvent. The molecular origin of this effect is usually the steric exclusion effect [6]. It occurs when one or both of the biopolymers are uncharged or when both biopolymers have similar charges. Particularly, aqueous mixtures of proteins and polysaccharides (ionic or not) give rise to thermodynamic incompatibility when the concentration of each polymer exceeds a certain level [7]. Interestingly, these phase-separated biopolymer systems can result in a variety of microstructures controlled by the mixing conditions and by the shearing of the mixture [6].

The two polymers which have been chosen within the present study to implement these systems are sodium alginate and sodium caseinate. Alginate is an anionic polysaccharide consisting of linear chains of (1–4)-linked- β -D-mannuronic and α -L-guluronic acid residues, chosen for its extensive use in food industry and its ability to gel by addition of CaCl_2 . Sodium caseinate is a salt of casein, a random coil polymer since the supra-molecular organization (micelles) was lost.

Lactococcus lactis is a very important commercial strain because of its wide use in the preparation of fermented dairy products. The main role of this bacterium during fermentation is acidification mainly through lactic acid production. Some *Lc. lactis* subsp. *lactis* strains are also used for food preservation because of their ability to produce bacteriocins such as nisin, lactacin and lactococcin [10]. The commercial LAB3 *Lc. lactis* subsp. *lactis* strain considered in this study has been selected for its bioprotective activity. LAB3 *Lc. lactis* subsp. *lactis* cells have been incorporated in a sodium alginate/sodium caseinate aqueous mixtures giving rise in phase-separated systems. Although many studies concerning proteins/polysaccharides (namely alginate/caseinate) systems have been published [9,11–13], to our knowledge the localization and the partition of LAB cells in such systems have not been considered elsewhere. Therefore, the main objective of this work was to localize cells of a LAB strain in a sodium alginate/sodium caseinate system. A prerequisite was the study of the segregative phase separation of the considered sodium alginate/sodium caseinate system at three pH values (ranging from 7.0 to 5.5) where viable and active LAB cells could be incorporated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Sodium caseinate (Cas) and sodium alginate (Alg) powders were from Fisher Scientific (United Kingdom) and Acros Organics (Belgium), respectively. Cas total protein content determined

by the Kjeldahl method was 93.20% (nitrogen conversion factor $N=6.38$). Cas and Alg moisture and ash contents were determined according to NF B 51-004 [14] and NF M 03-003 [15] standards, respectively.

Moisture and ash contents of Cas powder were both about 5%. The sodium caseinate composition was in agreement with the manufacturer data. Moisture and ash contents of Alg powder were 8.0% and 25.9%, respectively. The rather high percentage of ash of sodium alginate is due to the sodium content. Analytical grade imidazole ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$), acetic acid, sodium azide (NaN_3), sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid (HCl) were from Sigma Chemical (Germany). Distilled water was used for the preparation of all solutions and emulsions.

2.2. Preparation and incorporation of lactic acid bacteria in biopolymeric matrices

Lc. lactis subsp. *lactis* LAB3 strain (commercial starter MD089 (Ezal line, Rhône Poulenc, Dangé Saint-Romain, France)) was kept at -20°C in “de Man Rogosa Sharp” (MRS) broth [16] (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with glycerol (15%, v/v).

Surface properties of *Lc. lactis* LAB3 cells were investigated according to the Microbial Adhesion To Solvents (MATS) test described by Bellon-Fontaine et al. [17].

For cells preparation, the pre-culture was inoculated in MRS broth by a frozen sample and left 18 h at 30°C . The cells were harvested in the stationary growth phase, reached after 24 h incubation under anaerobic conditions at 30°C , by centrifugation ($4000 \times g$, 5 min, 4°C). They were washed twice with Tryptone Salt (TS) broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). After the last centrifugation, the cells were diluted in sterile distilled water and incorporated in 1.5% (w/w) Alg or in 1.5% (w/w) Alg – 4% (w/w) Cas at two different final concentrations: 10^8 CFU mL^{-1} (C1) and 10^4 CFU mL^{-1} (C2). These matrices were stocked at 30°C and LAB3 strain cells cultivability was measured by a classical enumeration on MRS agar plates.

For the enumeration of bacteria in Alg solution and Alg–Cas mixture at 0, 1, 2, 5, 8 and 12 days of storage, serial 10-fold dilution were performed on TS broth. In Petri dish, 1 mL of dilutions was added to supercooled MRS agar (at 50°C). After cooling, dishes were incubated at 30°C during 24 h under anaerobic conditions. The number of colony forming units (CFU) on MRS agar was counted and expressed relatively to the volume of polymeric mixture (CFU mL^{-1}).

2.3. Preparation of the mixtures and separation of the equilibrium phases

Stock solutions of Alg (4%, w/w) and Cas (20%, w/w) were prepared by dispersing powders in an acetate/imidazole buffer (5 mmol L^{-1} , pH 7) and stirred overnight with a magnetic stirrer until the proper hydration was reached. Sodium azide (0.02%, w/w) was added to the stock solutions as antimicrobial agent except in the case of addition of LAB3 cells. The pH was adjusted by adding HCl (1 mol L^{-1}) or NaOH (1 mol L^{-1}) and the solutions were then centrifuged (20°C , $12,500 \times g$, 15 min) to remove insoluble residues. The resulting solutions were kept at 4°C and used within one week for preparing the Alg/Cas mixtures with different ratios. For high biopolymer concentrations (Alg > 2.5% (w/w) and Cas > 7% (w/w)), mixtures were directly prepared from powders.

2.4. Determination of the phase diagram

In a preliminary study, visual observations for different Alg and Cas aqueous mixtures were done to check if macroscopic phase separation occurred. Different concentrations of Alg and Cas solutions

were added in 15 mL tubes. All concentrations were calculated on a weight percentage basis (w/w). The 15 mL tubes were vortexed until the mixtures became homogeneous. Phase diagrams of the water–Alg–Cas system were established at pH values of 7.0, 6.0, and 5.5 at room temperature. In order to speed up the macroscopic phase separation and to obtain a clear phase separation [18], tubes were centrifuged ($5000 \times g$, 15 min, 20°C). Macroscopic complete separation was considered as achieved when the volume of the upper phase was no longer decreasing. Otherwise centrifugation was repeated. The two distinct layers will be referred to as top phase and bottom phase.

Proteins concentration (% w/w) in each phase was determined following Kjeldahl method. Polysaccharides (% w/w) content was calculated according to the following formula: %polysaccharides = %dry matter – %proteins.

Dry matter was determined by oven-drying at 103°C until constant weight. For this calculation, it was assumed that salts were evenly distributed in the upper phase and in the bottom one.

The biopolymer concentrations of each separated phase obtained for different biopolymer mixtures were represented on the same diagram for the delimitation of the cosolubility and thermodynamic incompatibility zones. The binodal delimitation line was drawn according to the method described by Tolstoguzov [19].

2.5. Zeta (ζ)-potential measurement

The electrical charge (ζ -potential) of the used biopolymers (Cas and Alg) and of the LAB3 strain cells was measured using a particle electrophoresis instrument (Zetacompact, CAD Instruments, Les Essarts-le-Roi, France). The ζ -potential was determined by measuring the direction and velocity of particle movement in the applied electric field for pH values ranging from 4 to 8. Biopolymers or LAB3 strain cells were diluted to a concentration of approximately 0.001% (w/w) for Cas, 0.005% (w/w) for Alg, and 8×10^6 CFU mL⁻¹ for LAB3 cells (according to the method described in Section 2.2) with 5 mmol L⁻¹ imidazole/acetate buffer adjusted to the appropriate pH by using NaOH or HCl solutions (1 mol L⁻¹) prior to measurements. The diluted solutions/suspensions were mixed thoroughly and then injected into the measurement chamber of the particle electrophoresis instrument. The ζ -potential measurements are reported as the average and standard deviation of measurements performed on three freshly prepared samples.

2.6. Localization of LAB cells in caseinate/alginate phase separated systems by fluorescence microscopy

Optical microscope Axiovert 25 CFL (Prolabo, France) in fluorescence mode was used to observe the localization of the lactic acid bacteria in the biopolymeric systems. The epifluorescence microscope was connected to a camera (Nikon F90X).

Staining was performed using two different markers for cells and protein phase, respectively. For cells labeling, Live/Dead[®] BacLight kit[™] (Invitrogen, France) was used according to the supplier instructions. This kit contains two fluorochromes (Syto[®] 9 (green fluorescent nucleic acid stain) and propidium iodide (PI)) that distinguish cultivable, uncultivable viable cells and dead cells. Observations were made with the filters 09 (observations of cells staining with Syto[®] 9 and PI) and 00 (observation of cells labeling with PI) (excitation wavelength bandpass: 530–585 nm, emission wavelength: 615 nm). For caseinate labeling, 10 μL of Rhodamine B (1% w/v, R-1755, Sigma–Aldrich, USA) were added to 1 mL of each matrix. One drop was placed on a microscope slide with a glass cover and the preparation was observed with filter 43 (excitation wavelength bandpass: 525–545 nm, emission wavelength

bandpass: 605–670 nm) and with filters 00 and 09 when cells were incorporated into matrices.

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed using at least three freshly prepared samples. The results presented are the averages and standard deviations that were calculated from these replicate measurements. We ran a one-way ANOVA with a significance level set at 0.05. All statistical tests were performed using the Statgraphics centurion XV software (version 15.0.10, Sigmaplus, Levallois-Perret, France).

3. Results and discussion

3.1. Sodium alginate/sodium caseinate phase diagram

The diagram presented in Fig. 1 was established from macroscopic separation assessed by eye. The two biopolymers (Cas and Alg) were poorly miscible and the mixtures separated into an Alg rich phase (upper) and a Cas rich phase (bottom). This separation was observable for mixtures of Alg and Cas at concentrations exceeding 0.5% (w/w) and 5% (w/w), respectively. The appearance of two distinct phases after centrifugation is due to the interactions that occur between proteins and polysaccharides: electrostatic and/or hydrophobic interactions, size exclusion. These systems are characterized by repulsive forces between the protein and polysaccharide chains and this does not promote the association of the two polymers but rather each one “pushes” the other from its environment, creating the phase separation governed by thermodynamic incompatibility [20].

The present phase diagram was in qualitative agreement with previous studies concerning Alg/Cas mixtures [9,11–13]. Nevertheless, quantitative comparison is hindered by the different biopolymer sources used differing in their molecular weight distribution or in their linear structure, and by different salt concentration conditions. Subsequently, mixtures were selected in the zone of incompatibility and the amounts of protein and alginate present in each phase were measured by the Kjeldahl method and dry matter respectively, for solving the binodal curve at different pH values.

3.2. Effect of pH on alginate/caseinate phase diagram

pH is one key parameter for biopolymer interactions. Inter-macromolecular interactions, caused by the presence of complexing agents in a two-phase biopolymer mixture, can affect the phase equilibrium and the morphology of incompatible biopolymer mixtures [13]. Three different diagrams were determined at three different pH values: 7.0, 6.0, and 5.5 (Fig. 2). At pH = 7, the biphasic shape of the area representing demixing was typical of segregative phase separation since it is U-shaped [21]. The tie-lines were quite parallel to each other indicating that the charges brought by the two macromolecules had almost the same intensity. The binodal at pH = 7 was drawn in Fig. 1 (dashed curve) indicating that some mixtures presenting apparent phase separation were in the miscible zone. Incomplete phase separation from the mixture chosen to build the binodal could explain this contradictory discrepancy. This phenomenon occurred especially for concentrated mixtures as already shown elsewhere [22]. Meanwhile for reasons of high viscosity of the biopolymeric system, the mixtures did not separate completely and thermodynamic equilibrium could not be reached. Besides, pH variation of Alg and Cas mixtures seemed to affect significantly the shape of the diagrams. When the pH decreased and approached the Cas pI (4.5), the binodal shifted towards the axis of

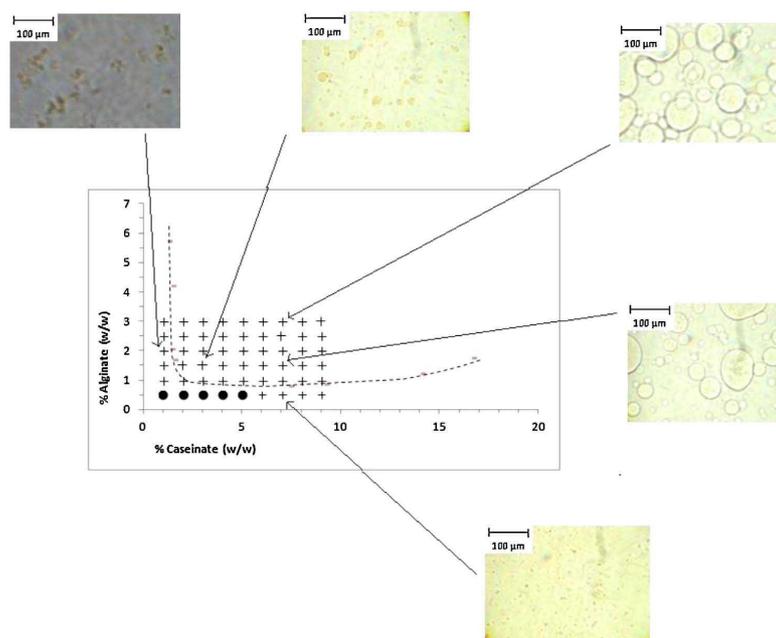


Fig. 1. Visual phase diagram of alginate/caseinate binary mixture at pH 7 (+: separated phase, ●: monophasic mixture). Binodal curve reported from Fig. 2(a) (dashed line) – microscopic observations 100 \times .

Cas and tie-lines were less parallel in particular at pH = 5.5. Moreover, the area of the biphasic zone was larger for pH = 7 than for pH = 5.5; this means that thermodynamic compatibility increased with pH.

As electrostatic repulsions are usually the major driving force for the segregative interaction between charged molecules in aqueous solutions [20,21,23,24], the ζ -potential of Alg and Cas were measured as a function of pH (Fig. 3).

Literature regarding the influence of pH on Cas/Alg aqueous mixtures state diagrams is scarce. However, the same type of behaviour was reported by Grinberg and Tolstoguzov [7] for ternary diagrams concerning aqueous mixtures of other biopolymers (dextran/globulin, arabic gum/globulin) at pH greater than 7. An increase of the incompatibility area was found between pH 8 and 10 for arabic gum/globulin mixtures, the trend of the binodal was identical to that obtained in this work. However, it is difficult to state a general rule since the conditions of incompatibility depend on the pair of used polymers and namely on their conformations (which strongly differ for caseinate and globulins).

3.3. Microstructure of Alg/Cas aqueous two-phase systems without LAB cells

From the established diagrams, some concentrations in the area of incompatibility at pH = 7 were chosen to observe the microstructures of such mixtures. Keeping a fixed polymer concentration, the concentration of the second polymer has been modified and vice versa. Microscopic observations are presented in Fig. 1.

The typical microstructure of water in water emulsion was observed on the different micrographs. According to literature, two polymers-based water in water emulsions are dispersions of spherical water droplets containing one polymer in a continuous aqueous phase containing the other [19,20,25]. In addition, the

concentration increase of one of the two biopolymers caused an increase in the droplets number and their size. The formation of spherical inclusions in Cas/Alg systems resulting from a nucleation and growth kinetic mechanism has been already described elsewhere [26]. In the present study, Cas/Alg two-phase systems were designed in order to assess their potential to entrap bioprotective lactic acid bacteria. The 1.5% (w/w) Alg – 4% (w/w) Cas composition taken from the incompatibility area at pH = 7.0 was chosen for this investigation. Microstructures of the initial mixture and of the two separated phases after centrifugation were observed by labeling caseinate with Rhodamine (Fig. 4). This particular composition showed a continuous phase of alginate with caseinate droplets dispersed within. There were some remaining alginate inclusions in caseinate rich phase and conversely. Indeed, the two-phase system obtained was viscous giving rise to incomplete segregative separation in accordance with the previous ascertainment concerning the binodal determination (see Section 3.2). Therefore, *Lc. lactis* subsp. *lactis* LAB3 cells were entrapped in Cas/Alg mixtures and microscopic investigations were conducted in order to study their localization in such matrices.

3.4. Partition and viability of LAB cells in the Alg/Cas two-phase system

Microscopic observations of mixtures of Alg and Cas (labelled with Rhodamine Fig. 4) after incorporation of *Lc. lactis* subsp. *lactis* LAB3 cells (labelled with the Live/Dead[®] BacLight kit[™]) revealed that cells were located in the caseinate-rich droplets whereas the alginate-rich continuous phase was free of any bacterial cell (Fig. 5). Live/Dead[®] BacLight kit[™] was chosen since it contains two nucleic acid stains (Syto[®]9 and propidium iodide) which can be used to differentiate live and dead cells. Live cells fluoresce green and dead cells fluoresce red. In future work, cell viability estimation will be

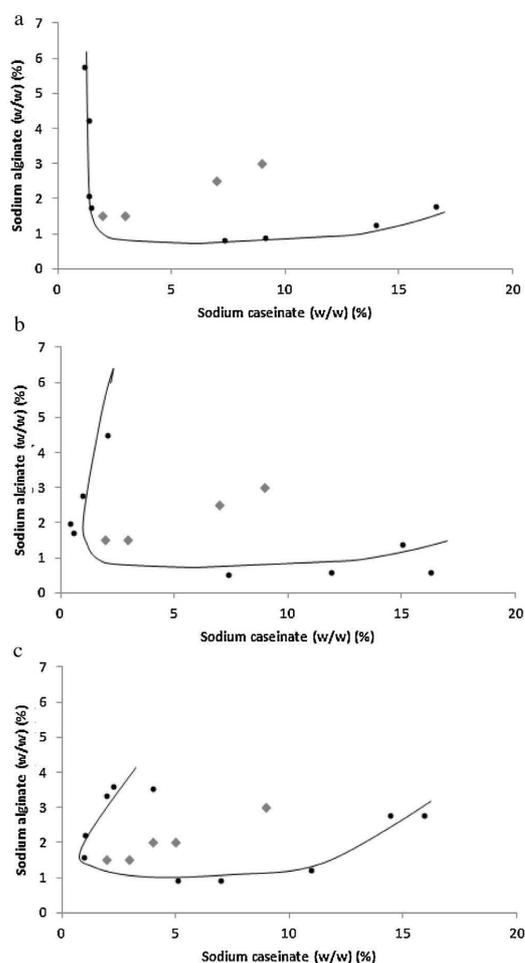


Fig. 2. Phase diagrams of alginate/caseinate binary mixtures at pH values of 7.0 (a), 6.0 (b) and 5.5 (c). ♦, initial composition of Alg/Cas mixtures and ●, composition of phases rich in one polymer after initial mixture phase separation.

performed by microscopy in addition to the classical enumeration on MRS agar plates.

This preferential localization of LAB factors could be explained by different factors. First, the adhesion of bacterial cells to surface or organic phase is known to be



Fig. 4. Caseinate phase labeling with Rhodamine B in 1.5% (w/w) alginate/4% (w/w) caseinate aqueous mixture (microscopic observations (100×) (filter 43)). (a) Mixture; (b) caseinate rich phase; (c) alginate rich phase.

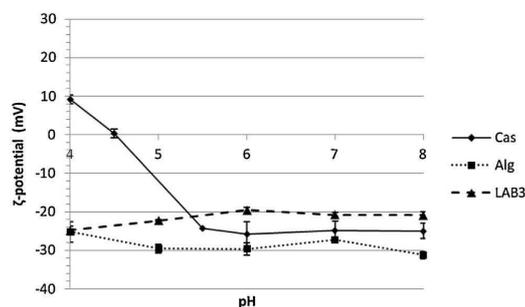


Fig. 3. ζ -potential changes in 0.001% (w/w) Cas, 0.005% (w/w) Alg and free LAB3 cells (8×10^6 CFU mL⁻¹) as a function of pH in 5 mmol L⁻¹ imidazole/acetate buffer, vertical bars represent the standard deviation of one independent study performed in triplicate.

mainly related to their own surface properties [27,28]. Non-specific interactions such as hydrophobic or electrostatic interactions are generally involved in such mechanism. The ζ -potential of LAB3 cells in solution was also determined and compared to the ζ -potential of the two biopolymers within the same pH range. It ranged from about -25 to -20 mV for pH values between 4 and 8 (Fig. 3). For pH values between 7 and 5 (pH range of the matrices designed to incorporate LAB3 cells), the three components (Alg, Cas, LAB3 cells) had an overall negative charge that should result in strong electrostatic repulsion. Nevertheless, the two biopolymer sources have a high salt (sodium) content and the cationic counterions in solution have the ability to reduce the repulsive interactions by a screening effect favouring other non specific interactions like hydrogen bonds or hydrophobic interactions. The surface properties of LAB3 cells was characterized using the Microbial Adhesion To Solvents (MATS) test (data not shown). LAB3 cells surface showed a clear hydrophilic character with a percentage of affinity to apolar solvents (hexadecane and hexane) below 30%. Moreover the MATS results revealed that the cell surface was distinctly electron donor (Lewis-base) since the affinity to Lewis-acid chloroform was distinctly higher than that to hexadecane. Despite the low hydrophobic character of LAB cells, the contribution of such non specific interactions cannot be excluded. While alginate is a highly hydrophilic macromolecules, caseinate like other proteins have hydrophobic groups along the unfolded peptidic chain able to promote association with the apolar binding sites at the surface of the LAB cells.

Only few publications deal with the distribution of bacterial cells in aqueous two-phase systems [29–31]. As pointed out by Umakoshi et al. [32], the partitioning of bacterial cells in artificial aqueous two-phase systems (dextran/polyethylene glycol) is influenced by different effects which act independently. The overall partition coefficient of the cells in such systems represents the different contribution of mainly electrostatic, hydrophobic, salt and

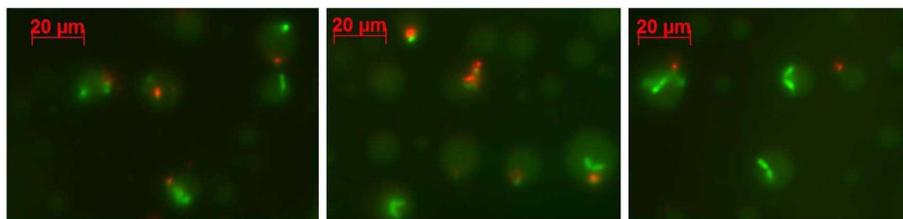


Fig. 5. Localization of cells in the 1.5% (w/w) alginate/4% (w/w) caseinate system at pH 7 – microscopic observations (filter 00 and 09) (100 \times) with LAB3 cells labeling with Live/Dead[®] BacLight[™] kit and caseinate phase labeling with Rhodamine B.

ligand effects. In the present case, this theory is consistent with a hydrophobic driven partitioning of LAB cells by considering that salt and electrostatic contribution are quite the same between the two phases. Preferential partitioning of bacterial cells was also observed for other aqueous two-phase systems such as poly(vinyl pyrrolidone) (PVP)/dextran [29], sodium polystyrene sulfonate or succinoglycan [31]. Schwarz-Linek et al. [31] highlighted depletion phenomena in bacteria-polymer mixtures. This mechanism explains how a suspension of spherical particles can be flocculated when a polymer is added to the medium. If the volume available between two particles is less than the volume occupied by the polymer, the space between the two particles is no longer accessible to the polymer promoting the self-adhesion of the polymer and the flocculation of the particles [19]. As LAB cells can be considered as spherical particles, alginate chains could have promoted the depletion of cells from their environment more intensively than the caseinate molecules explaining the exclusion of cells from the continuous alginate rich-phase in the present study.

Lc. lactis LAB3 cells were incorporated in mixtures (alginate and alginate-caseinate) at two different concentrations; approximately 10^8 CFU mL⁻¹ (C1) and 10^4 CFU mL⁻¹ (C2). Matrices were stored at 30 °C, LAB3 cultivability (Fig. 6) was measured by classical enumeration by agar plate method. For C2 initial loads, maximal cell density (about 10^6 CFU mL⁻¹) was reached after 48 h whatever the matrix type (alginate or alginate-caseinate). In Alg matrices, the population decreased significantly over the twelve days (final cell density: 10^{1-2} CFU mL⁻¹), while cells population in Alg/Cas matrices maintained at 10^{6-5} CFU mL⁻¹ from the 5th day to the 12th day. It seemed that alginate-caseinate matrix would be more effective to maintain LAB viability and activity (data not shown) which can be attributed to the proteic source. Nevertheless addition of protein in systems designed for microorganism protection gave variable

effects according to literature data. Millette et al. [33] entrapped LAB cells in calcium alginate-WPC (Whey Protein Concentrate) beads. WPC-containing beads had a maximal diameter but bacterial populations were significantly lower than those measured for alginate beads without WPC. Lopez-Rubio et al. [34] encapsulated *Bifidobacterium* strains in food hydrocolloids comparing WPC and pullulan as biopolymeric carrier. Pullulan was less efficient for encapsulation of *B. animalis* Bb12 due to microstructural effects. Pullulan capsules generated were smaller and forced bacteria to bend inside contributing to the lower stability of the cells when compared to the WPC-based structures. The authors also noted that differences in oxygen permeability on the protein-based and carbohydrate-based matrices may play a role in the observed results since the presence of oxygen may represent a threat for bifidobacterial survival.

4. Conclusion

The present study indicated that caseinate/alginate aqueous two-phase systems could be promising systems to entrap biopreservative microorganisms. The results demonstrated that LAB3 strain *Lc. lactis* subsp. *lactis* cells had more affinity to caseinate than to alginate. When *Lc. lactis* cells were incorporated in the Alg/Cas binary system, bacteria were localized in the protein droplets dispersed in an alginate continuous phase. This partition could be governed by multiple interactions effects with a dominant hydrophobic contribution. Depletion effect excluding the LAB cells from the polysaccharide phase cannot also be ruled out. This preferential localization of cells in the protein phase allowed a prolonged preservation of LAB3 strain cells viability when compared with systems containing only alginate. This advantage could be exploited to design a continuous system with an alginate gel phase and a caseinate dispersed one where the cells could locate and produce their active antimicrobials molecules. Future works will determine whether the system allows the release of antimicrobial substances produced by LAB3 *Lc. lactis* subsp. *lactis* cells.

References

- [1] S. Matamoros, F. Leroi, M. Cardinal, F. Gigout, F.K. Chadli, J. Cornet, H. Prévost, M.-F. Pilet, J. Food Protect. 72 (2009) 365.
- [2] M.I. Brachkova, M.A. Duarte, J.F. Pinto, Eur. J. Pharm. Sci. 41 (2010) 589.
- [3] H. Gialamas, K.G. Zinoviadou, C.G. Biliaderis, K.P.K.P. Koutsoumanis, Food Res. Int. 43 (2010) 2402.
- [4] A. Concha-Meyer, C. Schöbitz, R. Brito, R.R. Fuentes, Food Control 22 (2010) 485.
- [5] R. Iseppi, S. de Niederhäusern, I. Anacarso, P. Messi, C. Sabia, F. Pilati, M. Toselli, M. Degli Esposti, M. Bondi, Soft Matter 7 (2011) 8542.
- [6] A. Matalanis, O.G. Jones, D.J. McClements, Food Hydrocolloids 25 (2011) 1865.
- [7] V.Y. Grinberg, V.B. Tolstoguzov, Food Hydrocolloids 11 (1997) 145.
- [8] D.J. McClements, Biotechnol. Adv. 24 (2006) 621.
- [9] I. Capron, S. Costeux, M. Djabourov, Rheol. Acta 40 (2001) 441.
- [10] C. Charlier, M. Cretenet, S. Even, Y. Le Loir, Int. J. Food Microbiol. 131 (2009) 30.
- [11] J.C.G. Blonk, J. Van Eendenburg, M.M.G. Koning, P.C.M. Weisenborn, C. Winkel, Carbohydr. Polym. 28 (1995) 287.
- [12] M. Simeone, A. Alfani, S. Guido, Food Hydrocolloids 18 (2004) 463.
- [13] Y. Antonov, C. Friedrich, Polym. Bull. 58 (2007) 969.

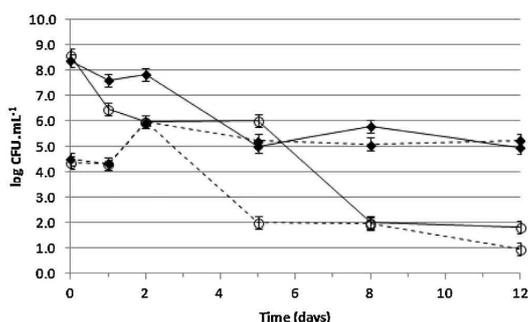


Fig. 6. *Lactococcus lactis* LAB3 counts in liquid biopolymeric matrices during 12 days storage at 30 °C. Alginate solution: 1.5% (w/w) sodium alginate (○). Alginate-caseinate aqueous mixture: 1.5% (w/w) sodium alginate + 4% (w/w) sodium caseinate (●). C1(–), matrix initial load in LAB3 cells at 10^8 CFU mL⁻¹; C2(–), matrix initial load in LAB3 cells at 10^4 CFU mL⁻¹.

- [14] AFNOR (Agence Française de Normalisation), NF B 51-004 Bois-détermination de l'humidité (1985).
- [15] AFNOR (Agence Française de Normalisation), NF M 03-003 Détermination du taux de cendre (1994).
- [16] J.D. de Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe, *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1960) 130.
- [17] M.N. Bellon-Fontaine, J. Rault, C.J. Van Oss, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 7 (1996) 47.
- [18] C. Schorsch, M.G. Jones, I.T. Norton, *Food Hydrocolloids* 13 (1999) 89.
- [19] V.B. Tolstoguzov, *Food Hydrocolloids* 17 (2003) 1.
- [20] I.T. Norton, W.J. Frith, *Food Hydrocolloids* 15 (2001) 543.
- [21] V.B. Tolstoguzov, *Food Hydrocolloids* 9 (1995) 317.
- [22] J.-L. Messiaon, A. Assifaoui, C. Lafarge, R. Saurel, P. Cayot, *Food Hydrocolloids* 28 (2012) 333.
- [23] V. Duclé, J. Richard, P. Saulnier, Y. Popineau, F. Boury, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 232 (2004) 239.
- [24] T. Harnsilawat, R. Pongsawatmanit, D. McClements, *Food Hydrocolloids* 20 (2006) 577.
- [25] S. Gaaloul, S.L. Turgeon, M. Corredig, *Food Biophys.* 5 (2010) 103.
- [26] C.F. Redigueri, O. de Freitas, M.P. Lettinga, R. Tuinier, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3345.
- [27] M.H. Ly, M. Naïtali-Bouchez, T. Meylheuc, M.-N. Bellon-Fontaine, T.M. Le, J.-M. Belin, Y. Waché, *Int. J. Food Microbiol.* 112 (2006) 26.
- [28] M.H. Ly, M. Aguedo, S. Goudot, M.L. Le, P. Cayot, J.A. Teixeira, T.M. Le, J.-M. Belin, Y. Waché, *Food Hydrocolloids* 22 (2008) 742.
- [29] A. Millqvist-Fureby, M. Malmsten, B. Bergensgåhl, *J. Colloid Interface Sci.* 225 (2000) 54.
- [30] K. Leja, R. Dembczyński, W. Białas, T. Jankowski, *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment* 8 (2009) 39.
- [31] J. Schwarz-Linek, G. Dorken, A. Winkler, L.G. Wilson, N.T. Pham, C.E. French, T. Schilling, W.C.K. Poon, *Europhys. Lett.* 89 (2010) 68003.
- [32] H. Umakoshi, R. Kuboi, I. Komasa, J. Ferment. Bioeng. 84 (1997) 572.
- [33] M. Millette, W. Smoragiewicz, M. Lacroix, *J. Food Protect.* 67 (2004) 1184.
- [34] A. López-Rubio, E. Sanchez, S. Wilkanowicz, Y. Sanz, J.M. Lagaron, *Food Hydrocolloids* 28 (2012) 159.

Annexe 5. Publication 2 dans Food Control

« Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* growth: comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells »

Food Control 37 (2014) 200–209



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* growth: Comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells

Lucie Léonard^{a,b}, Pascal Degraeve^a, Adem Gharsallaoui^a, Rémi Saurel^b, Nadia Oulahal^{a,*}^a Université de Lyon, Université Lyon 1, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil Université Lyon 1 – ISARA Lyon n°3733, Technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, 01000 Bourg en Bresse, France^b UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Agrosup Dijon, Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 June 2013
Received in revised form
10 September 2013
Accepted 17 September 2013

Keywords:
Lactococcus lactis
Sodium alginate
Sodium caseinate
Culturability
Anti-listerial activity

ABSTRACT

In order to design biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria (LAB) to control undesirable microorganisms growth in foods, the performances of alginate and alginate-caseinate (an aqueous two-phase system) matrices entrapping *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LAB3 cells were compared. Since efficient matrices should preserve the culturability and the antimicrobial activity of entrapped LAB3 cells for prolonged periods, they were both monitored for 12 days storage at 30 °C. Maximal cell density ($\sim 10^9$ CFU mL⁻¹) was reached after 24 h whatever the matrix type. Then, the LAB3 cells population decreased: 10^7 and 10^6 CFU mL⁻¹ were enumerated after 12 days in alginate-caseinate matrix and in alginate matrix, respectively. The anti-listerial activity assayed by an agar well method of LAB3 cells entrapped in alginate-caseinate matrices was also higher. LAB3 cells anti-listerial activity has been shown to be due to antimicrobial metabolites: hydrolysis by proteolytic enzymes of LAB3 cell-free culture supernatants (CFS) demonstrated the proteinaceous nature of at least a part of these metabolites. The higher antimicrobial activity of alginate-caseinate matrices might both result from the higher survival rate of bacterial cells and from a higher release of antimicrobial metabolites. To test this latter hypothesis, LAB3 CFS were incorporated in alginate and alginate-caseinate matrices and tested against *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. The anti-listerial activity of LAB3 CFS was higher in alginate-caseinate matrices indicating a better release of antimicrobial agents from this matrix. Alginate-caseinate matrices are thus better suited for LAB3 cells incorporation both for their survival and to promote the release of their antimicrobial metabolites.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing consumption of ready-to-eat (RTE) foods preserved by refrigeration (cooked, sliced products (meat, fruits, vegetables), salads), which have undergone minimal stabilization treatments to better preserve their organoleptic qualities, causes the emergence of new microbial risks. Among foodborne bacterial pathogens, *Listeria monocytogenes* is responsible for listeriosis which is the leading cause of severe disease or death especially for the elderly, pregnant women and their fetuses (Gialamas, Zinoviadou, Biliaderis, & Koutsoumanis, 2010), and

immunosuppressed (Gandhi & Chikindas, 2007). In Europe and other developed countries, an increase of listeriosis incidence has been observed in recent years (Goulet, Hedberg, Le Monnier, & De Valk, 2008; Lambertz et al., 2012). *Listeria monocytogenes* control remains a challenge because of its widespread occurrence and its ability to survive and persist even in hostile environments. These capabilities explain the difficulty to prevent the presence and the growth of *L. monocytogenes* in food, namely in minimally processed foods (Lehrke, Hernaez, Mugliaroli, Von Staszewski, & Jagus, 2011; Neunlist et al., 2005) and RTE foods. Sant'Ana, Barbosa, Destro, Landgraf, and Franco (2012) observed that *L. monocytogenes* was able to grow and reached high populations in several types of RTE vegetables when the vegetables were partially or fully kept at abuse temperature during shelf-life. Lambertz et al. (2012) studied other RTE food types and detected *L. monocytogenes* in 0.4% of 525 cheese

* Corresponding author. Tel.: +33 0 4 7445 5252; fax: +33 0 4 7445 5253.
E-mail address: nadia.oulahal@univ-lyon1.fr (N. Oulahal).

samples, 1.2% of 507 meat-product samples and 12% of 558 fish samples.

To control these microbiological hazards and develop new tools for biopreservation, the use and immobilization of viable lactic acid bacteria (LAB) has received considerable attention in the last twenty years (Scannell et al., 2000). Indeed several studies have shown that LAB can reduce the growth of *L. monocytogenes* in meat and seafood (Budde, Hornbæk, Jacobsen, Barkholt, & Koch, 2003; Jacobsen, Budde, & Koch, 2003; Lücke, 2000; Tahiri, Desbiens, Kheadr, Lacroix, & Fliss, 2009) and inhibit other foodborne pathogens (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus*) (Trias, Baneras, Badosa, & Montesinos, 2008). This antimicrobial activity is due to different mechanisms acting synergistically or not: competition for nutrients, pH lowering (with the production of organic acids), production of hydrogen peroxide, gas (carbon dioxide), reuterin, diacetyl or bacteriocins (Gálvez, Abriouel, & Ben Omar, 2007). They have become a primary tool for biopreservation particularly because they restrict the growth of undesirable microorganisms through competition and/or generation of antagonistic molecules such as organic acids and bacteriocins. Besides, for future applications, it is interesting that most of LAB are considered GRAS (Generally Recognized As Safe) by the U.S. Food and Drug Administration (Chen & Hoover, 2003; Dortu & Thonart, 2009). Particularly, *L. lactis* subsp. *lactis* is one LAB used for food preservation because of its ability to produce bacteriocins such as nisin (the only bacteriocin with a food additive status in the European Union), lactacin and lactococcin (Charlier, Cretenet, Even, & Le Loir, 2009).

Several researchers have observed a reduction of foodborne pathogenic bacteria populations within food samples (or models) wrapped in packagings containing LAB antimicrobial metabolites (mainly bacteriocins) (Cao-Hoang, Chaine, Gregoire, & Waché, 2010; Da Silva Malheiros, Daroit, Da Silveira, & Brandelli, 2010; Ercolini et al., 2010; Iseppi et al., 2011; Millette, Le Tien, Smoragiewicz, & Lacroix, 2007; Neetoo et al., 2008; Scannell et al., 2000) or, more recently, living LAB cells (Concha-Meyer, Schöbitz, Brito, & Fuentes, 2011; Gialamas et al., 2010; Iseppi et al., 2011; Sanchez-Gonzalez, Quintero-Saavedra, & Chiralt, 2013). Entrapment of bacteria in calcium alginate beads is the most widely used technique for cells immobilization in probiotic domain or biotechnology (Kim et al., 2008; Mandal, Puniya, & Singh, 2006; Sonomoto, Chinachoti, Endo, & Ishizaki, 2000). This new approach to control pathogen growth opens the lines of research on the possibility of using polymers as a support for viable pathogen antagonists and could lead to an alternative method of preservation.

The present work is focused on comparing anti-*Listeria* activity of *L. lactis* subsp. *lactis* LAB3 cells incorporated in alginate or alginate-caseinate matrices, the latter resulting in an aqueous two-phase system (Antonov & Friedrich, 2007; Antonov & Moldenaers, 2011; Capron, Costeux, & Djabourov, 2001; Caserta, Sabetta, Simeone, & Guido, 2005; Guido, Simeone, & Alfani, 2002; Léonard et al., 2013; Pacek, Ding, Nienow, & Wedd, 2000; Simeone, Alfani, & Guido, 2004; Simeone, Molè, & Guido, 2002). Caseinate was used in combination with alginate (a gelling polysaccharide) because (i) a preferential localization of cells in the caseinate phase was previously observed at microscopic scale in such aqueous two-phase systems (Léonard et al., 2013) and (ii) caseinate represents a potential source of nutrients. The culturability and the anti-*Listeria* activity of *L. lactis* LAB3 cells entrapped in alginate and alginate-caseinate matrices stored at 30 °C were monitored for 12 days. The anti-*Listeria* activity of *L. lactis* LAB3 culture cell-free supernatants was evaluated to identify the contribution of antimicrobial metabolites to their antimicrobial activity. Subsequently, the supernatants were incorporated into aqueous dispersions of alginate

and alginate-caseinate to assess the matrix effect on the release of antimicrobial metabolites produced by LAB3 cells. Finally, the results obtained allowed to compare the suitability of alginate and alginate-caseinate matrices for bioprotective LAB3 cells incorporation.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, media and growth conditions

L. lactis subsp. *lactis* LAB3 (commercial starter MD089, Ezal line, Rhône Poulenc, Dangé Saint-Romain, France) (Lamboley, Lacroix, Champagne, & Vuilleumard, 1997) were stored at –20 °C in “de Man Rogosa and Sharpe” broth (MRS_b) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 15% (v/v) glycerol. Before use, *L. lactis* LAB3 cells were subcultured under anaerobic conditions in MRS_b at 10% (v/v) for 24 h at 30 °C, then precultured in MRS_b at 10% (v/v) for 14 h at 30 °C and finally incubated at 30 °C for the requested experimental time.

The antagonistic activity was assayed against two target strains (isolated from industrial dairies) of *Listeria* genus: *Listeria innocua* LRGIA01 (Chadeau, Oulahal, Dubost, Favergeon, & Degraeve, 2010) and *L. monocytogenes* S162 (Mariani et al., 2011) (serotype 1/2a) (foodborne pathogenic strain). Stock cultures were maintained at –20 °C in Tryptone Soy Broth (TSB) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 15% (v/v) glycerol. Before each test, the two target strains were subcultured in TSB at 10% (v/v) for 7 h at 30 °C and then precultured in TSB at 10% (v/v) for 14 h at 30 °C.

For some tests, a 10,000 U.I.mL⁻¹ nisin solution was used as a positive control (100 mg of Nisaplin[®] (Danisco, Denmark) suspended into 10 mL of 0.02 mol.L⁻¹ HCl solution were stirred overnight at 4 °C). Then, the suspension was centrifuged (5000× g for 15 min at 4 °C). The supernatant was recovered and filtered through a 0.2 µm cut-off membrane (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) to obtain the 10,000 U.I.mL⁻¹ nisin solution which was stored at 4 °C until its use.

2.2. Preparation of polymeric matrices with LAB cells

A 4% (w/w) dispersion of sodium alginate (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom) and a 10% (w/w) dispersion of sodium caseinate (Acros Organic, Geel, Belgium) were prepared in sterile distilled water under sterile conditions and then stirred overnight at room temperature. To remove insoluble particles, solutions were then centrifuged (20 °C, 12,500× g, 15 min) and stored at 4 °C. Caseinate dispersion was heat-treated for 10 min at 90 °C before use.

Cells were recovered by centrifugation (15 min, 4 °C, 5000× g) from a (about 10⁸ CFU mL⁻¹) LAB3 culture in MRS_b (after 14 h incubation at 30 °C under anaerobic conditions following the addition of a 5% (v/v) inoculum). The cells were then washed twice in Tryptone Salt broth (TS) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). After the last centrifugation, the cells were resuspended in modified MRS_b (without acetate and phosphate) at two different concentrations: 10⁸ CFU mL⁻¹ (C1) and 10⁴ CFU mL⁻¹ (C2). These two cell suspensions were incorporated at 20% (w/w) in 1.5% (w/w) alginate or in 1.5% (w/w) alginate – 4% (w/w) caseinate solutions reconstituted from the stock dispersions. Samples were collected immediately after cell incorporation (“Day 0”) in matrices and after 1, 5, 8 and 12 days storage at 30 °C. All these samples were stored 4 h at 4 °C before cell counting and assaying their antimicrobial activity assays as described thereafter (2.5).

For cell counting, 1 mL of polymeric matrix was resuspended in 9 mL of TS. Serial decimal dilutions were made and then, 1 mL of the last three dilutions was plated in 20 mL of MRS agar (Biokar

Diagnosics, Beauvais, France) at 50 °C. After Petri plate homogenization and agar cooling, plates were incubated at 30 °C for 24 h under anaerobic conditions and then, Colony Forming Units (CFU) were counted.

2.3. Preparation of polymeric matrices with LAB cell-free supernatants

A LAB3 subculture in MRS_b was inoculated at 5% (v/v) in MRS_b and incubated anaerobically at 30 °C. Cell-free supernatants (CFS) were recovered at three different growth phases: mid-exponential phase (7 h), late exponential phase (9 h) and late stationary phase (24 h). Bacterial cells were removed by centrifugation (5000 × g for 15 min at 4 °C) and the supernatants (CFS) were filtered through a 0.2 µm cellulose membrane (VWR) and stored at –20 °C until use.

Alginate-CFS and alginate-caseinate-CFS mixtures were prepared from the polymeric stock dispersions (see 2.2), CFS, and distilled water to obtain the following final compositions: 20% (w/w) CFS in 1.5% (w/w) alginate or 1.5% (w/w) alginate and 4% (w/w) caseinate solutions.

2.4. Characterization of LAB3 antimicrobial activity

To get information on the nature of the antimicrobial metabolites produced by LAB3 cells, different treatments were applied to CFS prior to antimicrobial activity assays: (i) pH neutralization with 1 mol.L⁻¹ NaOH to assess the contribution of organic acids, (ii) different enzymatic and (iii) thermal treatments (detailed thereafter). To assess the potential contribution of peroxides, neutralized CFS was treated with catalase (300 U.mL⁻¹, C30, Sigma–Aldrich, St Louis, MO) at 37 °C for 1 h. Neutralized CFS was treated with either *Aspergillus oryzae* protease (P6610, Sigma–Aldrich), trypsin (from porcine pancreas, T4799, Sigma–Aldrich) or α-chymotrypsin (from bovine pancreas, C4129, Sigma–Aldrich) at a 1 mg.mL⁻¹ concentration for 3 h at 37 °C to assess the contribution of antimicrobial substances of proteinaceous nature (e.g. bacteriocins or bacteriocin-like substances). All enzymatic reactions were stopped by heating for 10 min at 65 °C. Neutralized CFS were heated at 40 °C, 65 °C, or 100 °C for 1 h to assess the thermal stability of antimicrobial substances. Antimicrobial activity of treated and untreated (control) CFS were assayed by the agar well diffusion method (see Section 2.5).

2.5. Anti-Listeria activity assay: agar well diffusion method

Tryptone Soy Agar medium (TSA) (Biokar Diagnostics) was inoculated at 10⁷ CFU mL⁻¹ by adding 1% (v/v) or 5% (v/v) of a 14 h culture of *L. monocytogenes* S162 or *L. innocua* LRGIA01 strain, respectively. Fifty milliliters of the resulting medium were poured into Petri dishes (140 mm diameter). After gelling at 4 °C for 30 min, wells with a diameter of 6 mm were cut aseptically on agar and filled with 40 µL of test sample (untreated and treated CFS, CFS mixed with alginate or alginate-caseinate, alginate or alginate-caseinate with LAB3 cells). These Petri dishes were placed at 4 °C for 3 h to allow diffusion of antibacterial substances. Finally, they were placed at 30 °C for 24 h to promote the growth of the two *Listeria* spp. strains. The presence of a distinct inhibition zone around the wells was considered as a positive antagonistic effect. The reading was done by measuring the diameter in mm of inhibition zones formed around the wells.

The diameter of inhibition (Zi) was calculated using the following formula:

$$Zi(\text{mm}) = \text{diameter of the inhibition zone observed (mm)} \\ - \text{wells diameter (mm)}.$$

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed through analysis of variance (ANOVA) with XLSTAT (XLSTAT 2010 version). The data were ranked and statistical differences were evaluated on the ranks with a one-way ANOVA and Tukey multiple comparison tests. In all cases, value of $p < 0.05$ was considered to indicate significant difference. In figures and tables, each letter indicates homogeneous statistical groups.

3. Results and discussion

3.1. LAB3 cells entrapment in polymeric matrices for an in situ production of antimicrobial compounds

Alginate or alginate-caseinate matrices containing MRS broth were initially loaded with LAB3 cells at 10⁸ CFU mL⁻¹ (C1) or 10⁴ CFU mL⁻¹ (C2). The culturable LAB3 cells present in each of these matrices were then enumerated by agar plate method for 12 days storage at 30 °C (Fig. 1) in order to compare the suitability of alginate and alginate-caseinate matrices for LAB3 cells growth and survival. For both initial bacterial loads, maximal cell density (~10⁹ CFU mL⁻¹) was reached after 24 h whatever the matrix composition (alginate or alginate-caseinate). The population then decreased significantly over the next 11 days to 10⁷ and 10⁶ CFU mL⁻¹ in alginate-caseinate and in alginate matrices, respectively. LAB3 cells survival was thus higher in alginate-caseinate matrix than in alginate matrix. Sanchez-Gonzalez et al. (2013) recently reported a better survival for 30 days storage at 4 °C in a 75% relative humidity atmosphere of live LAB in sodium caseinate and pea proteins films than in methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose films. Gialamas et al. (2010) also reported a good survival (less than 1 log(CFU cm⁻²) reduction) of live *Lactobacillus sakei* cells incorporated in sodium alginate films

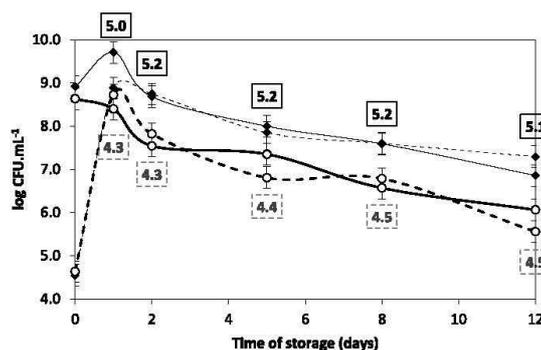


Fig. 1. *L. lactis* LAB3 counts in liquid polymeric matrices during 12 days storage at 30 °C. Polymeric matrices compositions: – Alginate matrix (○): 1.5% (w/w) sodium alginate; – Alginate-caseinate matrix (●): 1.5% (w/w) sodium alginate + 4% (w/w) sodium caseinate 20% (w/w) MRS broth was added to each matrix. C1(—), initial LAB3 cells load in matrix: ≈10⁸ CFU mL⁻¹. C2(- - -), initial LAB3 cells load in matrix: ≈10⁴ CFU mL⁻¹. From Day 1, pH values were framed in black above curve points for Alginate-caseinate matrix and were framed dotted in gray below curve points for Alginate matrix.

during their storage for 30 days at 25 °C or 4 °C. Concha-Meyer et al. (2011) also entrapped LAB (two *Carnobacterium maltaromaticum* strains) in alginate films containing starch and glycerol: they proposed that the important decrease of the anti-*Listeria* activity of these films following their storage at 4 °C for 20 days was due to death of LAB resulting from unfavorable conditions such as a decrease in nutrients. However, Brachkova, Duarte, and Pinto (2010) incorporated LAB in calcium alginate beads also containing MRS broth like in the present work and came to the conclusion that their viability remained stable for 6 months storage at 4 °C.

In our case, the positive effect of sodium caseinate addition to sodium alginate resulting in the formation of an aqueous two-phase system may thus result from a nutritional aspect: for instance Bury, Jelen, and Kimura (1998) observed that the addition of a protein source (whey protein concentrate) in a whey-based culture medium stimulated LAB growth. Nevertheless addition of protein to polysaccharides (such as alginate) does not always produce the same effect according to literature data. Millette, Smoragiewicz, and Lacroix (2004) entrapped LAB cells in calcium alginate-WPC (Whey Protein Concentrate) beads: bacterial populations within WPC-containing beads were significantly lower than those in alginate beads without WPC. López-Rubio, Sanchez, Wilkanowicz, Sanz, and Lagaron (2012) encapsulated *Bifidobacterium* strains in food hydrocolloids systems: protein (WPC) and carbohydrate (pullulan) capsules. Pullulan was less effective for encapsulation of *B. animalis* Bb12 due to a structure effect at the microscopic level. The authors indicated also that differences in oxygen permeability between the protein-based and carbohydrate-based matrices may play a role in the observed results since the presence of oxygen represent a threat for bifidobacterial survival. In the present case, these hypotheses remain to be investigated when the gelled system will be used in further works. Our previous work (Léonard et al., 2013) indicated a preferential localization of LAB cells in the aqueous two phase system formed by the solution of alginate and caseinate due to thermodynamic incompatibility. LAB cells adhered mainly to the protein-rich phase and this phenomenon could exert a protective effect during storage. Another positive contribution of caseinate incorporation in alginate may result from its higher buffering capacity which reduces pH decrease resulting from the production of organic acids such as lactic acid by LAB3 cells: caseinate buffering capacity maintained the pH at around 5.0 while the alginate systems pH was about 4.0. This less acidic pH in alginate-caseinate systems would thus reduce the acidic stress of LAB and favor their survival in such systems (Fig. 1).

The survival of living LAB3 cells in alginate and alginate-caseinate systems during their storage was a necessary but not sufficient condition to obtain bioprotective systems: indeed, the entrapped bacteria also have to effectively exert their antagonistic activity against *Listeria* spp. bacteria. Antimicrobial activity may be mediated directly by bacterial cells (such as in the case of competition for nutrients), by cell-bound molecules or by molecules released into the extracellular environment. Production and release of antimicrobial molecules by LAB is known to depend on factors such as substrate composition, cell density and population kinetics (Delgado et al., 2007; Holck, Axelsson, Birkeland, Aukrust, & Blom, 1992; Stoyanova & Levina, 2006; Tagg & Wannamaker, 1978). In the present work, the antagonistic activity of LAB3 cells was assayed by the classical agar well diffusion method based on the diffusion of the antimicrobial substances in an agar culture medium. This method could have some limits such as its sensitivity: a sufficient concentration of antimicrobial agents is required to observe a halo of inhibition on the target strain culture (Millette et al., 2004; Moraes et al., 2010; Van De Guchte, Ehrlich, & Maguin, 2001). Nevertheless, it was the most appropriate method to test our LAB strain because of the intended application (simulating food surface protection).

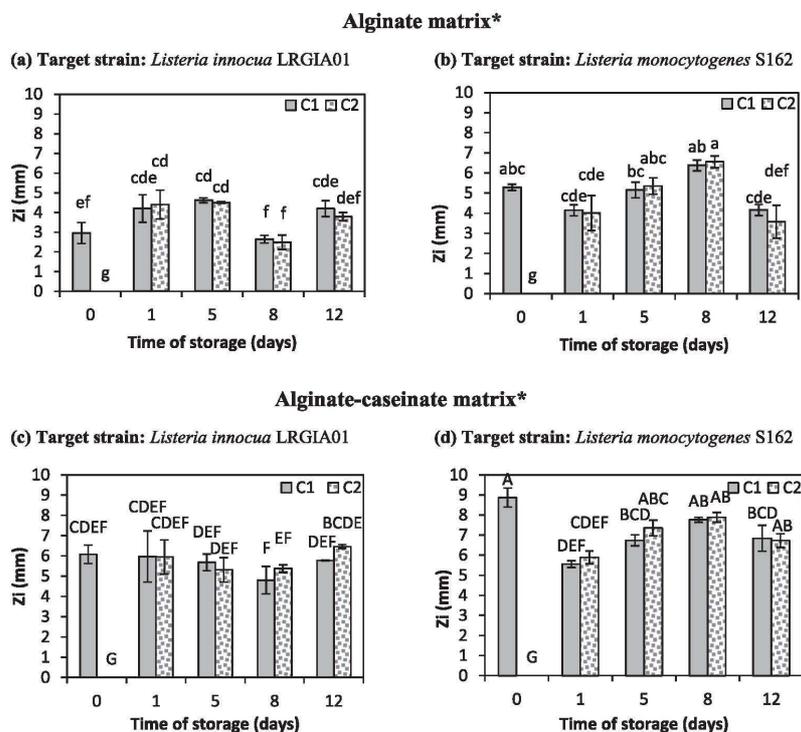
Therefore, the antimicrobial activity of LAB3 cells incorporated in alginate or alginate-caseinate matrices was monitored for 12 days storage at 30 °C by agar well diffusion assay against *L. innocua* LRGA01 and *L. monocytogenes* S162 strains, respectively (Fig. 2). For the highest LAB3 cells initial load (C1: 10^8 CFU mL⁻¹), a significant antagonistic activity against both *Listeria* spp. strains tested was immediately observed for both matrices, while for both matrices initially loaded with only 10^4 CFU mL⁻¹, no antimicrobial activity could be immediately detected. However, inhibition zones appeared after 24 h incubation once the LAB3 cells populations had raised to $\sim 10^9$ CFU mL⁻¹ as previously stated (Fig. 1). LAB3 bacterial cells initial load is thus a key parameter for the potential application of such systems: a substantial initial number of cells is necessary for an immediate activity, while if an activity after 24 h is needed, a lower initial bacterial load could be sufficient. Besides pointing out that the more LAB3 cells, the higher the anti-*Listeria* activity, it is noteworthy to indicate that for many species of bacteria, the excretion of antimicrobial compounds, particularly bacteriocins, and the immunity to these compounds are regulated by a system of Quorum Sensing (QS) (Czárán & Hoekstra, 2007). This QS system results in the ability for a population of bacteria to release and respond to signaling molecules. Bacteria are able to sense population density by a system composed by receptor and transduction machinery involving the release of bacteriocins and immunity factors. Such a mechanism might also explain the earliest antimicrobial activity for the C1 (10^8 CFU mL⁻¹) initial LAB3 cells load where the population is large enough.

After the first day of storage at 30 °C, the antimicrobial activity was regular over the next 11 days (Fig. 2). However, it could not be determined whether the activity measured after 12 days was due to the production of antimicrobials during 12 days or to their production at the early stage of the incubation time followed by a slow diffusion. It is also noteworthy that the antagonistic activity against *L. monocytogenes* S162 strain was always higher than against *L. innocua* LRGA01 strain.

Another clear trend is the significantly higher ($p < 0.05$) antimicrobial activity of alginate-caseinate matrices than that of alginate matrices. This indicates that the antimicrobial activity observed was not mainly due to the pH decrease since, as previously stated, matrix acidification was higher in alginate matrix than in alginate-caseinate matrix. However, this higher anti-*Listeria* activity of alginate-caseinate mixtures could also be due to (i) a higher culturable cells population density (about 1 log CFU mL⁻¹ higher than in alginate matrix from day 2 to day 12) and/or (ii) to a better release of antimicrobial metabolites from these matrices to agar gel. To check this latter hypothesis, LAB3 cultures CFS were added to alginate and alginate-caseinate matrices and their respective antimicrobial activities were determined by the agar well diffusion method. Before incorporating LAB3 cultures CFS in alginate and alginate-caseinate systems, LAB3 CFS antimicrobial activity was directly checked by agar well diffusion.

3.2. Antimicrobial activity of LAB3 culture cell-free supernatants (CFS)

CFSs were prepared from LAB3 cultures at 30 °C under anaerobic conditions in MRS broth. The 30 °C incubation temperature was chosen because the antimicrobial activity of CFS prepared from *L. lactis* LAB3 cells incubated at this temperature was optimal (data not shown). Indeed, the optimal conditions for production of antimicrobial metabolites are generally not the same as the optimal growth conditions according to literature. For example, bacteriocin production was found higher when LAB growth occurred between 25 °C and 30 °C (Enan, El-Essawy, Uyttendaele, & Debevere, 1996; Matsusaki, Endo, Sonomoto, & Ishizaki, 1996; Todorov et al., 2011)



***Results obtained in alginate matrix and alginate-caseinate matrix formed two statistically different groups following ANOVA ($p < 0.05$).**

For each matrix type, different letters indicate statistically different groups ($p < 0.05$).

Fig. 2. Inhibition zone diameters (Zi (mm)) for liquid polymeric matrices with *Lc. lactis* LAB3 cells stored at 30 °C for 12 days over *L. monocytogenes* S162 and *L. innocua* LRGIA01 measured by agar well diffusion method ($n = 3$). (a) Activity of alginate matrix against *L. innocua* LRGIA01. (b) Activity of alginate matrix against *L. monocytogenes* S162. (c) Activity of alginate-caseinate matrix against *L. innocua* LRGIA01. (d) Activity of alginate-caseinate matrix against *L. monocytogenes* S162. Polymeric matrices compositions: –Alginate matrix: 1.5% (w/w) sodium alginate; –Alginate-caseinate matrix: 1.5% (w/w) sodium alginate + 4% (w/w) sodium caseinate 20% (w/w) MRS broth was added to each matrix. C1, matrix initial load in LAB3 cells at $\approx 10^8$ CFU mL⁻¹. C2, matrix initial load in LAB3 cells at $\approx 10^4$ CFU mL⁻¹.

while optimal temperatures for growth were between 30 °C and 37 °C. Moreover, anaerobic conditions were chosen because further work aims to investigate bioprotective ability of LAB cells entrapped in biopolymeric matrices. Besides, Moares et al. (2010) reported that LAB cells produce more bacteriocins or bacteriocin-like substances under anaerobiosis.

Antimicrobial activity against *L. innocua* LRGIA01 and *L. monocytogenes* S162 of CFSs prepared from LAB3 *Lc. lactis* cells sampled out after 7 h (i.e. at mid-exponential growth phase, P1), 9 h (i.e. at late exponential growth phase, P2) and 24 h (i.e. at late stationary phase, P3) was assayed by the classical agar well diffusion method (Fig. 3). The transfer of antimicrobial substances can thus be compared with that of a bacteriocin like nisin which was used as positive control. Inhibition zone obtained with LAB3 CFSs were more important than with "Nisin 200UI" (Fig. 3b). This was a first indication of the bioprotective potential of LAB3 strain.

CFSs were prepared from LAB3 cells at mid-exponential, late exponential growth phase and late stationary phase since the production of antimicrobial metabolites is more or less associated

with bacterial growth depending on antimicrobial metabolites types. While most of lactic acid and bacteriocin production is coupled with LAB growth, for instance, the relationship between cell number and the amount of nisin produced by nisin-producing LAB strains is not linear in both batch and continuous modes (Parente & Ricciardi, 1999). Indeed, nisin is a molecule that self-regulates its own production (Quiao et al., 1996).

The observed inhibition zones increased during growth and antimicrobial activity was maximal in the stationary phase (i.e. at the end of the culture: after 24 h incubation at 30 °C) (Fig. 3). The same type of results has already been observed by other authors and this could be explained by an accumulation in the supernatant of active antimicrobial compounds produced throughout the growth (Trias et al., 2008; Van De Guchte et al., 2001).

L. innocua and *L. monocytogenes* show similar physiological properties with the difference that the first one does not belong to pathogenic species of *Listeria* (Ammor, Tauveron, Dufour, & Chevillier, 2006). In the present study, the two *Listeria* strains used showed some differences of sensitivities and responses to

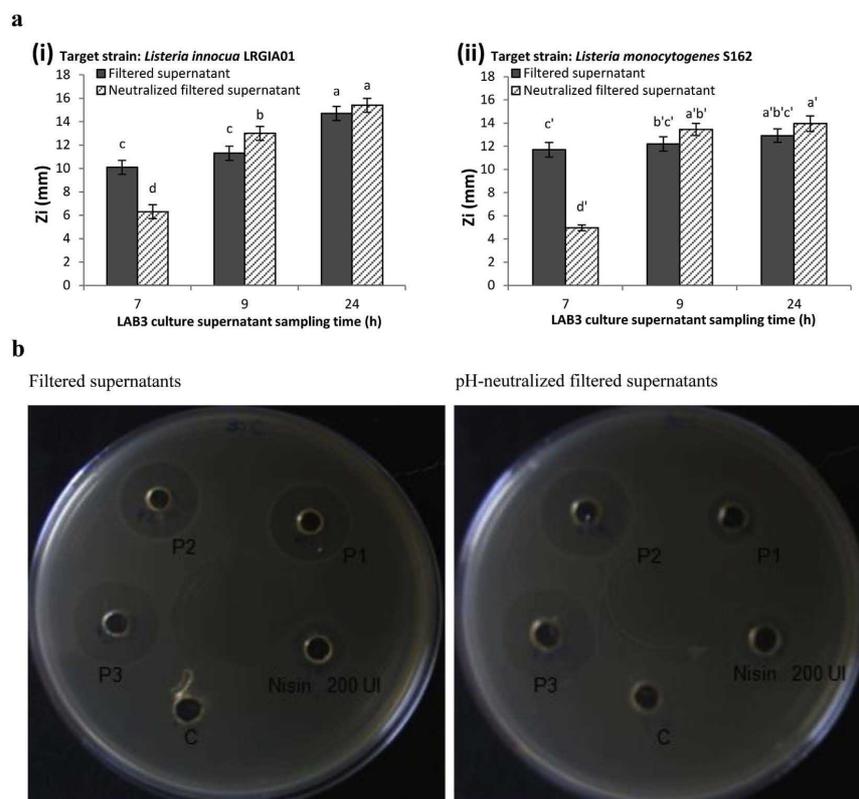


Fig. 3. a. Antimicrobial activity of *Lc. lactis* LAB3 culture supernatants collected after 7 h (P1, pH 4.9), 9 h (P2, pH 4.4) and 24 h (P3, pH 4.0) incubation at 30 °C in MRS₆ under anaerobic conditions. Antimicrobial activity against *L. innocua* LRGI A01 and *L. monocytogenes* S162 strains of each culture supernatant was assayed by agar well diffusion method. The anti-*Listeria* activity is expressed by the size of the inhibition zones (Zi (mm)) ($n = 3$). b. Illustration of antimicrobial activity assay against *L. monocytogenes* S162 by agar well diffusion method. Well C: MRS broth (negative control); well *Nisin 200UI*: 0.04 mL of a 5000 UI mL⁻¹ nisin solution (positive control); wells P1, P2, P3 correspond to *Lactococcus lactis* LAB3 culture supernatants collected after 7 h, 9 h, and 24 h incubation at 30 °C in MRS₆ under anaerobic conditions, respectively.

LAB3 antimicrobial agents (Fig. 3a). For example, concerning *L. innocua* LRGI A01, results at 7, 9 and 24 h (LAB3 culture supernatants sampling times) formed three statistically different groups ($p < 0.05$), whereas concerning *L. monocytogenes* S162, antimicrobial activities of CFS sampled out after 9 h and 24 h incubation were similar ($p = 0.887$). Besides, *L. monocytogenes* S162 was more sensitive than *L. innocua* LRGI A01 to active agents present in supernatants recovered after 7 h and 9 h incubation, whereas *L. innocua* LRGI A01 was more sensitive than *L. monocytogenes* S162 to active agents present in the supernatant recovered after 24 h incubation. Indeed some authors reported a greater sensitivity of *L. monocytogenes* towards some antimicrobial compounds than *L. innocua*. Different sensitivities between one strain of *L. innocua* or *L. monocytogenes* to another have already been reported (Çon, Gökalp, & Kaya, 2001; Mataragas, Drosinos, & Metaxopoulos, 2003). In 2001, Çon et al. compared the sensitivity of 9 *L. monocytogenes* strains and 7 *L. innocua* strains against 6 bacteriocin-producing LAB strains. Their results revealed the complexity of antimicrobial responses. For example, *Listeria* isolate number 52 was the less sensitive strain to *Lactobacillus sake* Lb 706 (positive control) but against *Pediococcus acidilactici* 413 and 419 LAB strains, *Listeria* isolate number 52 was among the most

sensitive strains. Mataragas et al. (2003) tested crude extract from 2 LAB cultures against 15 *Listeria* spp. strains (6 *L. innocua* and 9 *L. monocytogenes* strains). For one LAB culture, *L. monocytogenes* strains seemed to be more sensitive compared to *L. innocua* strains whereas it was difficult to conclude for the other LAB cultures. Anyway, for each antimicrobial compound, the inhibition depends on the target microorganism (Ramos et al., 2012; Richard, 1996) and the comparison between one study and another is restricted because different methods and distinct experimental conditions were used (concentration range, temperature, pH, culture medium, target strain population density, physiological state) (Ramos et al., 2012).

In order to estimate the contribution of organic acids production to the antimicrobial activity of *Lc. lactis* LAB3 CFS sampled out after 7, 9 or 24 h culture at 30 °C, the antimicrobial activity of pH-neutralized CFS was also assayed (Fig. 3). Indeed, organic acids can only penetrate the microbial target cell wall in their non-dissociated form (at a pH below their pKa). The pKa value of the most common acids produced by LAB is below 5.0 (De Muynck et al., 2004). *Lc. lactis* strains mainly produce lactic acid, from which pKa is 3.8. Thus, adjusting the pH values of the CFSs at 7.0 should exclude antimicrobial activity of organic acids. At mid-

exponential phase (P1: 7 h), the inhibition diameter of *L. monocytogenes* S162 was reduced to approximately 50% of its initial value after pH-neutralization. Subsequently, the effect of CFS pH neutralization was no more significant suggesting that other antimicrobial molecules than organic acids were produced. Indeed, quite the totality of antimicrobial activity of CFSs recovered after 9 and 24 h culture was preserved or even improved when pH was neutralized (Fig. 3a). For example, pH-neutralized CFS sampled out after 9 h culture gave an inhibition zone diameter against *L. innocua* LRGA01 of 13.0 ± 0.6 mm whereas corresponding diameter measured with non-neutralized CFS was 11.3 ± 0.6 mm. Other antimicrobial agents than organic acids were thus not inactivated by this pH change. This differed from Zhang, Liu, Bao, and Zhang (2010) results who reported a pH dependent mechanism with a synergistic action of lactic acid and the other secreted molecules, because lactic acid acted as a permeabilizer of the outer membrane of pathogens permitting the penetration of other antimicrobial molecules.

3.3. Characterization of LAB3 cell-free supernatant antimicrobial activity

In order to get additional information on the nature of other antimicrobial agents than organic acids present in *L. lactis* LAB3 CFSs, *L. lactis* LAB3 CFSs collected after 24 h incubation at 30 °C in MRS broth under anaerobic conditions were neutralized and treated at different temperatures (40, 65 or 100 °C for 1 h) or with different enzymes at 37 °C for 1 h (catalase) or 3 h (proteolytic enzymes). Corresponding residual antimicrobial activities were measured by agar well diffusion method against *L. innocua* LRGA01 (Fig. 4). Only CFSs collected after 24 h culture were tested since it was previously observed (Fig. 3) that these neutralized CFSs had a significantly higher *L. innocua* LRGA01 inhibition zone diameter ($p > 0.05$) than CFSs collected after 7 or 9 h.

No statistically significant difference of antimicrobial activity between catalase-treated neutralized CFS and non-treated neutralized CFS was observed. This suggests that peroxides did not contribute significantly to the anti-*Listeria* activity of neutralized CFS. This is consistent with the fact that CFSs were prepared

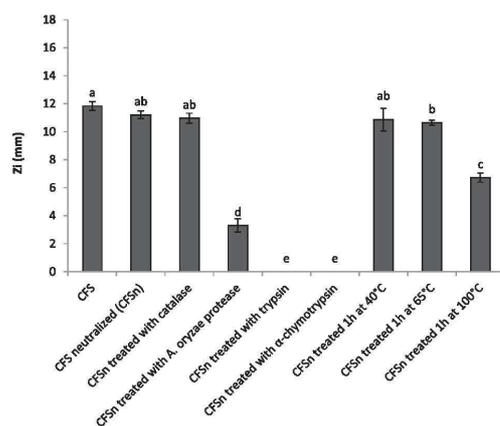


Fig. 4. Antimicrobial activity of *L. lactis* LAB3 culture supernatants (CFS) and CFS treated at different temperatures or with enzymes. CFS was collected after 24 h incubation at 30 °C in MRS broth under anaerobic conditions. Antimicrobial activity assayed by agar well diffusion method against *L. innocua* LRGA01 is expressed by the size of the inhibition zones (Zi (mm)) ($n = 3$).

from a LAB3 cell culture under anaerobic conditions which were reported to inhibit the production of peroxides by LAB (Çon et al., 2001; De Martinis, Púbbio, Santarosa, & Freitas, 2001).

A 1 h incubation of neutralized CFS with *A. oryzae* protease resulted in a ~75% reduction of its *L. innocua* LRGA01 inhibition zone diameter, while antimicrobial activity of neutralized CFS treated either by trypsin, or by α -chymotrypsin could no more be detected by the agar well diffusion method. The fact that neutralized CFS antimicrobial activity was partially or totally lost after the action of proteolytic enzymes allows asserting that antimicrobial substances in neutralized CFS from *L. lactis* LAB3 cells were proteinaceous.

Moreover, antimicrobial metabolites present in neutralized CFS were not affected by a 1 h thermal treatment at 40 °C or 65 °C, while a 1 h treatment at 100 °C induced a ~30% decrease of the *L. innocua* LRGA01 inhibition diameter.

Taken together, the thermostability characteristics and the susceptibility to proteolytic enzymes of molecules responsible for the antimicrobial activity of *L. lactis* LAB3 neutralized CFS support the proposal that these antimicrobial metabolites are likely bacteriocin-like substances. Production of different types of class I and class II bacteriocins (nisin (A, Z, Q, F forms) (~3 kDa), lactacin 481 (~3 kDa, produced by *L. lactis* CNRZ481 or ADRIA85L030), lactacin 3147 (~3 kDa, produced by *L. lactis* DPC3147), lactococcin MMFII (produced by *L. lactis* MMFII), lactococcin G, lactococcin M) by several *L. lactis* strains were already reported by several authors (Alkhatib, Abts, Mavaro, Schmitt, & Smits, 2012; Bierbaum & Sahl, 2009; Chen & Hoover, 2003; McAuliffe, Ross, & Hill, 2001; Parente & Ricciardi, 1999). It seems that a bacteriocin producing strain corresponds to a precise bacteriocin. Further experimentations will thus be carried out to purify and identify the bacteriocin-like substance(s) produced by *L. lactis* LAB3 strain.

Before incorporating *L. lactis* LAB3 CFS in alginate and alginate-caseinate matrices to assay their antimicrobial activity by agar well diffusion method and thus the kinetics of mass transfer of antimicrobial metabolites present in these matrices to agar gel in contact, it was useful to get information on the nature of these antimicrobial metabolites.

3.4. Anti-*Listeria* activity of polymeric matrices entrapping LAB3 cell-free supernatants

Direct incorporation of *L. lactis* LAB3 cells either in alginate or in alginate-caseinate matrices led to the conclusion that the antimicrobial activity assayed by agar well diffusion method of alginate-caseinate matrices was always higher. However, this methodology could not establish whether this resulted only from a higher antimicrobial metabolites production or if this also resulted from a higher release of antimicrobial metabolites from such matrices to agar. Therefore, *L. lactis* LAB3 CFS (prepared from LAB3 cultures sampled out after 7, 9 or 24 h incubation at 30 °C under anaerobic conditions) were incorporated at a 20% (w/w) concentration in alginate or alginate-caseinate matrices, and their respective antimicrobial activities were assayed by agar well diffusion method (Table 1). Moreover, comparison of antimicrobial activity of matrices incorporating LAB3 CFSs and neutralized LAB3 CFSs, allowed getting an estimation of the respective contributions of organic acids and non-acidic antimicrobial metabolites (presumably bacteriocin-like substances, as previously stated). When interpreting results, it should be noted that in addition to the phenomenon of antimicrobial metabolites diffusion in agar due to the test method chosen, a second phenomenon, i.e. their release from the matrices (alginate and alginate-caseinate), has to be taken into account. As expected, *Listeria* spp. inhibition zones diameters were far lower than those measured following direct addition of LAB3 CFSs in wells (Fig. 3) because only

Table 1
Antimicrobial activity of *Lc. lactis* LAB3 culture supernatants added to liquid biopolymeric matrices.

Matrix type	Supernatants	Time (h)	pH	Zi (mm)	
				<i>L. innocua</i> LRGIA01	<i>L. monocytogenes</i> S162
Alginate*	Native	7	4.9	2.52 ± 0.20 ^d	3.91 ± 0.21 ^c
		9	4.7	3.52 ± 0.50 ^{cd}	5.11 ± 0.38 ^b
		24	4.3	3.31 ± 0.46 ^{cd}	5.57 ± 0.26 ^b
	Neutralized	7	7.1	2.48 ± 0.08 ^d	3.17 ± 0.42 ^{cd}
		9	6.8	3.07 ± 0.33 ^{cd}	5.13 ± 0.50 ^b
		24	6.8	2.71 ± 0.39 ^d	6.83 ± 0.53 ^a
Alginate-Caseinate*	Native	7	5.8	3.99 ± 0.25 ^f	4.99 ± 0.32 ^e
		9	5.6	5.03 ± 0.41 ^e	6.35 ± 0.16 ^b
		24	5.3	5.35 ± 0.01 ^d	6.45 ± 0.19 ^b
	Neutralized	7	6.6	0.00 ± 0.00 ^g	4.79 ± 0.20 ^e
		9	6.6	4.95 ± 0.28 ^e	6.81 ± 0.11 ^a
		24	6.6	5.71 ± 0.20 ^{cd}	7.34 ± 0.16 ^a

*Results obtained in alginate matrix and alginate-caseinate matrix formed two statistically different groups following ANOVA ($p = 0.003$). For each matrix type, different letters indicate statistically different groups ($p < 0.05$).

(i) *Lc. lactis* LAB3 culture supernatants were collected after 7 h, 9 h, or 24 h incubation at 30 °C in MRS broth under anaerobic conditions.

(ii) Polymeric matrices compositions.

– Alginate matrix: 1.5% (w/w) sodium alginate.

– Alginate-caseinate matrix: 1.5% (w/w) sodium alginate + 4% (w/w) sodium caseinate 20% (w/w) supernatants were added to each matrix.

(iii) The antimicrobial activity of each matrix containing *Lc. lactis* LAB3 culture supernatant was assayed by agar well diffusion method against *L. innocua* LRGIA01 and *L. monocytogenes* S162 strains. The anti-*Listeria* activity is expressed by the size of the inhibition zones (Zi (mm)) ($n = 3$).

20% (w/w) of supernatant were added to matrices in the present case (i.e. the quantity of antimicrobial metabolites deposited in wells was five times lower). Moreover, interactions of antimicrobial metabolites with alginate and/or caseinate can limit or hinder their release from the matrix to agar.

It can be concluded from results reported in Table 1 that whatever the matrix and the CFS sampling time, *L. monocytogenes* S162 was always more sensitive than *L. innocua* LRGIA01 to the antimicrobial agents which diffused in agar. As previously observed with CFSs alone, the *Listeria* spp. inhibition zone diameters increased or remained constant when the CFSs sampling time increased (the two apparent decreases (*L. innocua* LRGIA01 as target strain, CFS sampling time: 24 h vs. 9 h) were not statistically significant at the $p > 0.05$ level and were thus considered constant). Anti-*L. innocua* LRGIA01 activity of alginate matrices were similar whatever the sampling time of culture supernatants incorporated within.

Matrices containing pH-neutralized CFSs had almost the same antimicrobial activity as matrices containing native CFSs: inhibition zone diameters in each condition of matrices containing neutralized supernatants and non-neutralized supernatants did not form two different statistical groups ($p < 0.05$) suggesting thus that the contribution of organic acids was limited.

Overall, alginate-caseinate matrices incorporating CFS had a significantly higher antimicrobial activity than alginate matrices ($p = 0.003$). This suggests a better release of the antimicrobial

metabolites in the presence of caseinate, likely related to the interactions and the structure effects within mixtures. However, the exact antimicrobial metabolites release mechanism cannot be determined since CFSs contain various active compounds and residual molecules from the culture medium: every element capable of adsorbing the antimicrobial molecules may influence their diffusion and accordingly, their antimicrobial efficiency (Blom, Katla, Hagen, & Axelsson, 1997).

4. Conclusion

Lc. lactis subsp. *lactis* LAB3 strain showed an antagonistic activity against two *Listeria* spp. strains. Interestingly, it was demonstrated that once incorporated in alginate-caseinate aqueous two phase systems, LAB3 cells better survived and had a higher anti-*Listeria* activity (average of 2 mm more on the diameter of the inhibition zone, assayed by the agar well diffusion method) than in alginate systems for 12 days at 30 °C: 10^7 and 10^6 CFU mL⁻¹ were enumerated after 12 days in alginate-caseinate matrix and in alginate matrix, respectively. The higher culturable cells population density in alginate-caseinate matrix might result from its composition (presence of proteins) and its particular microstructure both. It was established that *Listeria* spp. growth inhibition zones observed mainly resulted from other antimicrobial metabolites than organic acids (likely bacteriocin-like substances, which should now be identified): a *L. innocua* LRGIA01 inhibition zone of 11.21 ± 0.27 mm was measured for a LAB3 neutralized CFS and no inhibition zone was detected for a LAB3 trypsin or α -chymotrypsin treated CFS. The incorporation of these antimicrobial metabolites (cell-free culture supernatants) in alginate-caseinate and alginate matrices allowed observing that their release from alginate-caseinate matrices to agar is higher. It can thus be concluded that the higher antimicrobial activity of alginate-caseinate matrices incorporating *Lc. lactis* LAB3 cells not only resulted from the higher living bacterial cells population in such systems but also from the better release of antimicrobial metabolites (presumably bacteriocin-like substances). *Lc. lactis* LAB3 cells will now be entrapped in gelled alginate-caseinate matrices like beads or films which could be tested for their capacity to inhibit undesirable microorganisms growth in real fresh foods or at their surface.

Acknowledgments

The authors wish to gratefully acknowledge Conseil Régional de Bourgogne and Syndicat Mixte du Technopole Alimentec (Fonds de Développement de la Recherche) for their financial support and PhD grant of Lucie LEONARD.

References

- Alkhatib, Z., Abts, A., Mavaro, A., Schmitt, L., & Smits, S. H. J. (2012). Lantibiotics: how do producers become self-protected? *Journal of Biotechnology*, 159, 145–154.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale fertility 1-screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17, 454–461.
- Antonov, Y., & Friedrich, C. (2007). Aqueous phase-separated biopolymer mixture compatibilized by physical interactions of the constituents. *Polymer Bulletin*, 58, 969–978.
- Antonov, Y. A., & Moldenaers, P. (2011). Structure formation and phase-separation behaviour of aqueous casein-alginate emulsions in the presence of strong polyelectrolyte. *Food Hydrocolloids*, 25, 350–360.
- Bierbaum, G., & Sahl, H.-G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 2–18.
- Blom, H., Katla, T., Hagen, B. F., & Axelsson, L. (1997). A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 103–109.
- Brachkova, M. I., Duarte, M. A., & Pinto, J. F. (2010). Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. in calcium alginate beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(5), 589–596.

- Budde, B. B., Hornbæk, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., & 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.
- Bury, D., Jelen, P., & Kimura, K. (1998). Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 149–151.
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Gregoire, L., & Waché, Y. (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27, 940–944.
- Capron, I., Costeux, S., & Djabourov, M. (2001). Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions. *Rheologica Acta*, 40, 441–456.
- Caserta, S., Sabetta, L., Simeone, M., & Guido, S. (2005). Shear-induced coalescence in aqueous biopolymer mixtures. *Chemical Engineering Science*, 60(4), 1019–1027.
- Chadeau, E., Oulahal, N., Dubost, L., Favregeon, F., & Degraeve, P. (2010). Anti-*Listeria innocua* activity of silver functionalized textile prepared with plasma technology. *Food Control*, 21, 505–512.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., & 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.
- Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 82–100.
- Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, 22(3–4), 485–489.
- Çon, A. H., Gökçalp, H. Y., & Kaya, M. (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, 59(4), 437–441.
- Czárán, T., & Hoekstra, R. F. (2007). A spatial model of the evolution of quorum sensing regulating bacteriocin production. *Behavioral Ecology*, 18(5), 866–873.
- Da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., Da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2010). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, 27, 175–178.
- De Martinis, E. C. P., Públio, M. R. P., Santarosa, P. R., & Freitas, F. Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 32–37.
- De Muyne, C., Leroy, A. I. J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, 159, 339–346.
- Delgado, A., López, F. N. A., Brito, D., Peres, C., Fevêreiro, P., & Garrido-Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, 130(2), 193–201.
- Dortu, C., & Thonart, F. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13(1), 143–154.
- Enan, G., El-Essawy, A. A., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (1996). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 189–215.
- Ercolini, D., Ferracino, I., La Storia, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., et al. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*, 27, 137–143.
- Gálvez, A., Abriouel, H., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., & Koutsourmanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10), 2402–2408.
- Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., & De Valk, H. (2008). Increasing incidence of Listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 734–740.
- Guido, S., Simeone, M., & Alfani, A. (2002). Interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate by drop deformation in shear flow. *Carbohydrate Polymers*, 48, 143–152.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.-E., Aukrust, T., & Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of General Microbiology*, 138, 2715–2720.
- Iseppi, R., De Nierhäusern, S., Anacarso, I., Messi, P., Sabia, C., Pilati, F., et al. (2011). Antilisterial activity of coatings entrapping living bacteria. *Soft Matter*, 7, 8542–8548.
- Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 242–249.
- Kim, S.-J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O.-J., Shin, I.-S., Cha, D. S., et al. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT – Food Science and Technology*, 41(3), 493–500.
- Lambertz, T. S., Nilsson, C., Brådenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L.-M., et al. (2012). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in three categories of ready-to-eat foods in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, 160(1), 24–31.
- Lamboley, L., Lacroix, C., Champagne, C. P., & Vuilleumard, J. C. (1997). Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(5), 502–516.
- Lehrke, G., Hernaez, L., Mugliaroli, S. L., Von Staszewski, M., & Jagus, R. J. (2011). Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural antimicrobials. *Lwt-food Science and Technology*, 44(4), 984–991.
- Léonard, L., Gharsallaoui, A., Ouali, F., Degraeve, P., Waché, Y., Saurel, R., et al. (2013). Preferential localization of *Lactococcus lactis* cells entrapped in a caseinate/alginate phase separated system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 266–272.
- López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., & Lagaron, J. M. (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 28, 159–167.
- Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56(2), 105–115.
- Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190–1195.
- Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J.-F., Dubois-Brissonnet, F., Notz, E., & Briandet, R. (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control*, 22, 1357–1362.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., & Matakopoulos, J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4+/-2 °C. *Food Microbiology*, 20, 259–265.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* 10-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 36–40.
- McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 285–308.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., & Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18, 878–884.
- Millette, M., Smoragiewicz, W., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1184–1189.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Vicoso, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 1320–1324.
- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H., Joergel, R. D., Hicks, D. T., & Hoover, D. G. (2008). Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 8–15.
- Neunlist, R. M., Ralazamahaleo, M., Cappellet, J.-M., Besnard, V., Federighi, M., & Leroi, F. (2005). Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability, and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. *Journal of Food Protection*, 68(7), 85–91.
- Pacek, A. W., Ding, P., Nienow, A. W., & Wedd, M. (2000). Phase separation and drop size distributions in "homogeneous" Na-alginate/Na-caseinate mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 42, 401–409.
- Parente, E., & Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 628–638.
- Quiao, M., Ye, S., Koponen, O., Ra, R., Usabiaga, M., Immonen, T., et al. (1996). Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 626–634.
- Ramos, O. L., Santos, A. C., Leão, M. V., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., et al. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*, 25, 132–141.
- Richard, J. (1996). Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs: mythe ou réalité? *Le Lait*, 76, 179–189.
- Sanchez-Gonzalez, L., Quintero-Saavedra, J. I., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33, 92–98.
- Sant'Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., & Franco, B. D. G. M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 52–58.
- Scannell, A. G. M., Hill, C., Ross, R. P., Marx, S., Hartmeier, W., & Arendt, E. K. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 241–249.
- Simeone, M., Alfani, A., & Guido, S. (2004). Phase diagram, rheology and interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate. *Food Hydrocolloids*, 18, 463–470.
- Simeone, M., Molé, F., & Guido, S. (2002). Measurement of average drop size in aqueous mixtures of Na-alginate and Na-caseinate by linear oscillatory tests. *Food Hydrocolloids*, 16, 449–459.
- Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N., & Ishizaki, A. (2000). Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* 10-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1–3), 325–334.
- Stoyanova, L. G., & Levina, N. A. (2006). Components of fermentation medium regulate bacteriocin synthesis by the recombinant strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116. *Microbiology*, 75(3), 286–291.

- Tagg, J. R., & Wannamaker, L. W. (1978). Streptococin A-FF22: nisin-like antibiotic substance produced by a group A *Streptococcus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *14*(1), 36–39.
- Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C., & Fliss, I. (2009). Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiology*, *26*, 783–793.
- Todorov, S. D., Prevost, H., Lebois, M., Dousset, X., Leblanc, J. G., & Franco, B. D. G. M. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)-from isolation to application: 1. characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, *44*(5), 1351–1363.
- Trias, R., Baneras, E., Badosa, L., & Montesinos, E. (2008). Bioprotection of golden delicious apples and iceberg lettuce against food borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *123*, 50–60.
- Van De Guchte, M., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(1), 147–153.
- Zhang, Y., Liu, Y., Bao, Y., & Zhang, H.-P. (2010). Influence of pH, heat and enzymatic treatments on the activity of antibacterial substance in MRS and milk media produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agricultural Sciences in China*, *9*(6), 911–920.

Annexe 6. « Intensification of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* antimicrobial activity by modulating the culture medium composition and the incubation temperature »

International conference: Food Science, Engineering and technologies 2012. University of Food Technologies (UFT). Plovdiv, Bulgarie (19-20 octobre 2012). Résumé publié dans Scientific Works of UFT, Volume LIX-2012, section Biotechnology, Nanotechnology, Ecology, pp. 609-615

НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА УФТ
ТОМ LIX-2012
"ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И ТЕХНОЛОГИИ"



SCIENTIFIC WORKS OF UFT
VOLUME LIX-2012
"FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGIES"

Intensification of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* antimicrobial activity by modulating the culture medium composition and the incubation temperature

L. Léonard^{a,b}, P. Gencheva^c, P. Degraeve^a, R. Saurel^b, N. Oulaha^a

^aUniversité de Lyon, Université Lyon 1, Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA, Equipe Mixte d'Accueil Université Lyon 1 - ISARA Lyon n°3 733), France

^bEquipe PAPC, UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques

Agrosup Dijon-Université de Bourgogne, France

^cUniversity of Food Technologies, Plovdiv, Bulgaria

Abstract

The influence of environmental conditions (pH, medium composition, temperature, ...) on the antimicrobial activity of lactic acid bacteria (LAB) was investigated in anaerobic culture. Two *Lactococcus lactis* strains (ATCC 11454 and LAB3) were thus cultured on four MRS media supplemented with either 0, 10, 30 or 50 g/L of lactose. Antimicrobial activity was evaluated by an agar well diffusion method on two different indicator strains: *Listeria innocua* LRGLA01 and *Kocuria rhizophila* ATCC 9341. Supplementations of MRS medium with lactose did not enhance significantly the antimicrobial activity of the two LAB strains. Besides, the two LAB strains tested in this study (ATCC 11454 and LAB3) showed a wide diversity of metabolites produced. LAB3 cell-free supernatant (CFS) had an important anti-*Listeria* activity whereas ATCC 11454 CFS had a better activity against *K. rhizophila* (it is a sensitive strain). The loss of antimicrobial activity observed following LAB3 CFS treatment by proteolytic enzymes suggests that this strain would produce bacteriocin-like antimicrobial substances.

Keywords: *Lactococcus lactis*, antimicrobial activity, MRS medium, lactose, *Listeria innocua*, *Kocuria rhizophila*

Introduction

Lactic Acid Bacteria (LAB) are Gram-positive, non-motile, non-sporulating, anaerobic and aerotolerant. Their energy comes from fermentation. They are responsible for many food fermentation processes and used as starter-cultures in the food industry [1]. Besides several studies have shown that LAB can reduce the growth of *Listeria monocytogenes* in meat and seafood [2] [3] [4] and inhibit food-spoilage bacteria and other foodborne pathogens (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *S. enteritidis* and *Staphylococcus aureus*) [5]. This antimicrobial activity is due to different mechanisms acting in synergy or not: competition for nutrients, pH lowering (with the production of organic acids), production of hydrogen peroxide, gas (carbon dioxide), reuterin, diacetyl or bacteriocins [6]. LAB become a primary tool for biopreservation namely because most of them are considered GRAS (Generally Recognized

As Safe) by the U.S. Food and Drug Administration. For instance, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* is one of LAB which is very used for food preservation because of its ability to produce bacteriocins such as nisin (the only bacteriocin recognised as a food preservative in many countries), lactacin and lactococcin [7].

The growth in consumption of ready-to-eat foods preserved by refrigeration (cooked, sliced products, salads), which have undergone minimal stabilization treatments to better preserve their organoleptic properties, is the cause of the emergence of new microbiological risks. Nevertheless, *L. monocytogenes* remains the leading bacterial food fight. This bacterium is responsible for listeriosis, a severe disease especially in the elderly, pregnant women and their fetuses [8] and the immunosuppressed people [9]. In Europe and other developed countries, an increase of listeriosis incidence has been observed in recent years [10].



L. monocytogenes is a Gram-positive bacterium, facultative anaerobic, able to grow at pH 4.5 to 9.2 [11], at temperatures ranging from 2 to 42 °C and tolerates NaCl concentrations above 14% [12]. These capabilities explain the difficulty in controlling the presence and the growth of *L. monocytogenes* in food, especially in minimally processed foods [12] [13].

To control these microbiological hazards and develop new tools for biopreservation, it is important to determine the optimal micro-environmental conditions to obtain the best LAB antimicrobial properties and to determine the mechanisms responsible for this activity. According to the literature, the variation of different factors can enhance production of antimicrobial agents by LAB: pH, medium composition, incubation temperature... [14] For example, MRS and M17 media have been reported as suitable media for promoting growth and nisin expression with *L. lactis* [15]. Nevertheless, in this latter study, the recommended concentrations for the synthetic media did not promote neither the expression of nisin-encoding gene, nor its

Materials and methods

Bacterial strains, media and growth conditions

L. lactis ATCC 11454 and *L. lactis* LAB3 (commercial starter MD089 (Ezal line, Rhône Poulenc, Dangé Saint-Romain, France)) were stocked at -20 °C in "de Man Rogosa and Sharpe" broth (MRS₆) (Biokar Diagnostic, France) supplemented with 15% glycerol (v/v). Before use, the cultures were transferred twice in M17 or MRS₆ and incubated at 30 °C for 24h under anaerobic conditions.

The antagonistic activity was assayed against *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 and *Listeria*

production. However, it was strongly influenced by the addition of skimmed milk to MRS and M17 broth. Supplementation of LAB specific culture media (MRS, M17) with a carbon source (glucose, lactose,...) has often been studied [16] [17]. Lactose is frequently reported as an essential nutrient for optimal production of antimicrobial agents [18] [19]. Besides it is difficult to search for the major factors and optimize them for biotechnological processes including many variables [20].

This work has focused on anti-*Kocuria* (strain sensitive to Nisin A [21]) and anti-*Listeria* activity of two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: ATCC 11454 (known to produce Nisin A [22]) and LAB3 (commercial starter MD089 (Ezal line, Rhône Poulenc, Dangé Saint-Romain, France)). Lactose-supplemented MRS media were tested. MRS broth was chosen for this study because most of the strains of the rest of the collection available for this research project belonged to the *Lactobacillus* genus. The antimicrobial activity was assayed by testing culture supernatants by an agar well diffusion method.

inocua LRGIA01. Stock cultures (Biodymia collection) were maintained at -20 °C in Tryptone Soy Broth (TSB) (Biokar Diagnostic, France) supplemented with 15% glycerol (v/v). Before each test, indicator strains were grown in TSB at 10% (v/v) for 7 h, then subcultured on the same medium at 10% (v/v) and finally incubated for 14 h at 30°C. Nisin solution (used as a positive control for antimicrobial activity assays) was prepared from Nisaplin® (2.5 % (w/w) nisin preparation, Danisco AS, United-Kingdom) by dissolving Nisaplin® in a 0.02 M HCl solution overnight at 4°C. Then a



centrifugation (4 °C, 5000 x g, 15 min) allowed to eliminate insoluble particles and obtain a 1000 IU/mL nisin solution.

LAB cell-free supernatants recovery

Cultures of LAB were performed at 5% (v/v) of inoculum from a subculture in M17 or MRS_b anaerobically at 30 °C for LAB3 strain or at 25 °C for ATCC 11454 strain in the different media presented in Table 1.

Table 1. LAB culture media tested

<i>Listeria</i> composition (pH 6.4)	Yeast	Lactose (g/L)
10 g polypeptone	MBS	0
10 g meat extract	MBS/10	10
5 g yeast extract	MBS/30	30
20 g glucose	MBS/50	50
1.08 g Tween 80		
2 g dipotassium phosphate		
5 g sodium acetate		
2 g ammonium citrate		
0.2 g magnesium sulphate		
0.05 g manganese sulphate		

LAB cell-free supernatants (CFS) were recovered at stationary phase (i. e. after 24.5 h incubation). Bacterial cells were removed by centrifugation (15 min, 4 °C, 5 000 x g) (SIGMA 3K18, Bioblock Scientific). CFSs were then filtered through a 0.2 micrometer membrane (VWR) and stored at -20 °C. The neutralization of CFS with NaOH 1 mol.L⁻¹ was carried out after defrosting and before each test.

Characterization of LAB antimicrobial activity

To determine the mechanisms of antimicrobial action of the two LAB strains in the different media, different tests were performed on the CFSs (pH neutralization, enzymatic and thermal treatments). The first treatment consisted in CFSs pH neutralization and allowed not to consider the antimicrobial activity of organic acids. To determine the role of peroxides, another fraction was neutralized and then treated with catalase (300 U.mL⁻¹, C30, Sigma-Aldrich) at 37 °C for 1h. The

reaction was stopped by incubating the samples 10 min at 65 °C. To test the presence of bacteriocins, neutralized CFS were treated separately with three different proteases: protease (from *Aspergillus oryzae*, P6110, Sigma-Aldrich), trypsin (from porcine pancreas, T4799, Sigma-Aldrich) and α-chymotrypsin (from bovine pancreas, C4129, Sigma-Aldrich) at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ for 3h at 37 °C. The enzymatic reactions were stopped by heating for 10 min at 65 °C the CFSs. Thermal stability of antimicrobial substances was assessed by assaying the antimicrobial activity of neutralized CFSs following their treatment at 40 °C, 65 °C or 100 °C for 1 h. The residual anti-*Kocuria* and anti-*Listeria* activities were tested with the agar well diffusion method.

Anti-*Listeria* activity assay: agar well diffusion method

The appropriate agar medium, Tryptone Soy Agar (TSA) (Biokar Diagnostic, France), was inoculated at 1% (v/v) with the *K. rhizophila* ATCC 9341 strain and at 5% (v/v) with the *L. innocua* LRGIA01 strain. 50 mL of this agar were poured into Petri dishes (diameter 140 mm). After gelling at 4 °C for 30 min, wells of 6 mm diameter were made aseptically in agar and filled with 40 µL of untreated and treated CFS samples. These Petri dishes were placed at 4 °C for 3h to allow diffusion of antibacterial substances. Finally they were then placed in the optimal conditions for growth of the two indicator strains: 30 °C for 24h. The reading was done by measuring the diameter in mm of inhibition zones formed around the wells. The diameter of inhibition Zi was performed using the following formula:

Zi (mm) = diameter of the inhibition zone obtained (mm) - diameter of wells (6 mm).



Results/Discussion

For the LAB3 and ATCC 11454 strains, the best antimicrobial activities were detected in supernatants of cultures performed respectively at 30°C and 25°C (data not shown). This is consistent with bibliographic data which indicate that the highest yields of production of antimicrobial agents are attained in cultures between 25 and 30°C [23]. This temperature frequently differs from the temperature for an optimal growth. Nevertheless, differences of antimicrobial responses from one LAB strain to another make it difficult to edit general rules.

The CFSs obtained from cultures of *L. lactis* ATCC 11454 performed in the four MRS based media (Table 1) showed no significant differences on the anti-*Kocuria* activity (Figure 1). After CFS neutralization, inhibition zones decreased by 1-2 mm. Therefore the anti-*Kocuria* activity of CFS was also due to other metabolites than organic acids. Since neutralized CFS treated by catalase showed an antimicrobial activity similar to neutralized CFS, antimicrobial activity was not due to peroxide. Besides, the only difference of the antimicrobial activity of supernatants according to the culture medium was the residual activity after heat treatment at 100°C. Antimicrobial metabolites present in the supernatants recovered from cultures in MRS media supplemented with 30 or 50 g/L of lactose were not stable after treatment at 100°C. Residual antimicrobial activity was present after treatment with trypsin and protease but the activity disappeared after treatment with α -chymotrypsin. Therefore the antimicrobial peptides present were sensitive to α -chymotrypsin and partially sensitive to trypsin and protease.

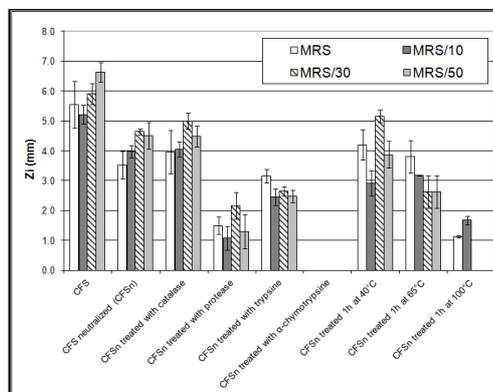


Figure 1. Anti-*K. rhizophila* ATCC 9341 activity of untreated and treated CFS (collected from the cultures made in the different MRS/[lactose concentration (g.L⁻¹)] media at 25°C) of *L. lactis* ATCC 11454 (agar well diffusion method) (n=3)

The supernatants of LAB3 strain cultures did not show any anti-*Kocuria* activity. Supplementations with lactose did not increase anti-*Kocuria* activity. Thereafter the choice was made to only consider non-supplemented MRS broth. For the anti-*Listeria* activity, the CFSs of the two LAB strains did not present similar trends (Figure 2): LAB3 CFSs were much more effective than ATCC 11454 CFSs.

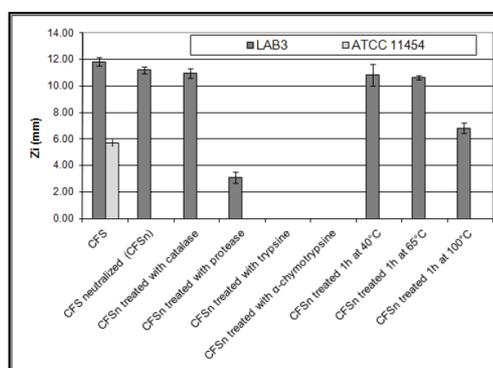


Figure 2. Comparison of anti-*L. innocua* LRGIA01 activity of *L. lactis* ATCC 11454 and LAB3 CFSs (treated and untreated collected from culture performed in MRS broth at 25°C and 30°C, respectively) (agar well diffusion method) (n=3)

Indeed, whatever the treatment (neutralization, action of catalase or proteolytic enzymes, or heat); ATCC 11454 strain CFSs did not show any anti-*Listeria* activity. On the other hand, the LAB3 anti-



Listeria CFS were only affected following the action of proteolytic enzymes: thus LAB3 strain likely produced antimicrobial peptides partly responsible for the observed anti-*Listeria* activity. These results showed (i) a wide range of sensitivity between *Listeria* and *Kocuria* and (ii) a wide diversity of metabolites produced by the two *L. lactis* strains.

LAB3 and ATCC 11454 are two *L. lactis* subsp. *lactis* strains but their antimicrobial activities strongly differed. Indeed, ATCC 11454 strain CFS (treated and untreated) inhibited *K. rhizophila* ATCC 9341, a nisin A sensitive strain [21] whereas only untreated CFS had an activity against *L. innocua* LRGIA01. This indicator strain seemed to be less sensitive than *K. rhizophila* and not sensitive to the same antimicrobial agents. ATCC 11454 strain is known to produce nisin A [22], so *L. innocua* LRGIA01 would not be sensitive to nisin A and LAB3 would not be a nisin A producing strain. Besides, even if the activity spectra of nisin A and Z are quite similar, the difference in solubility is remarkable, nisin A being more soluble at acidic pH than nisin Z [24] [25]. This may have an influence in the differences of inhibition observed between our two target strains.

L. lactis strains are known to produce nisin.

It was therefore interesting to compare the results of antimicrobial activity of LAB3 and ATCC

Conclusion

LAB bacteriocins production could be optimized by changing environmental conditions: pH, medium composition, incubation temperature, ... However, tests of MRS broth supplementation with lactose did not exert a significant influence on the antimicrobial activity of the two LAB strains

11454 strains treated CFS with a solution of nisin, which underwent the same treatments (Figure 3). This nisin solution was prepared from Nisaplin®. This nisin form was demonstrated to be heat-stable; to have anti-*Listeria* activity and was sensitive to the three proteolytic enzymes used.

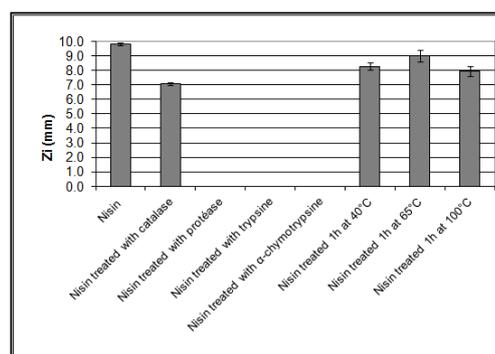


Figure 3. Anti-*L. innocua* LRGIA01 activity of 1 000 UI/mL Nisin solution (treated and untreated) (agar well diffusion method) (n=3)

Concerning LAB3 antimicrobial metabolites characterization, only LAB3 CFS treated with proteolytic enzymes had lost their anti-*Listeria* activity, so LAB3 would likely produce bacteriocin-like inhibitory substance. According to literature, these bacteriocins could be nisin (A, Z), lactacin (481, 3147), lactococin, enterocin A [22] [26] [27].

considered: non-supplemented MRS broth remained thus privileged for further studies. Besides, the two LAB strains tested in this study (*L. lactis* ATCC 11454 and LAB3) showed a wide diversity of metabolites produced. LAB3 CFS had an important anti-*Listeria* activity whereas ATCC



11454 CFS had a better activity against *K. rhizophila* (a nisin A sensitive strain). According to CFS treatments by proteolytic enzymes, LAB3 would produce bacteriocin-like inhibitory

substances. In order to develop a new tool for biopreservation, LAB3 cells will be entrapped in alginate/caseinate matrices and their antimicrobial activity tested.

References

- [1] Rosario Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V. and B., de las Rivas (2011). Chapter 8 - Lactic Acid Bacteria, *Molecular Wine Microbiology*, 191-226.
- [2] Budde, B.B., Hornbæk, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and A.G., Koch (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 (2): 171-184.
- [3] Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56 (2): 105-115
- [4] Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C. and I., Fliss, (2009). Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiology*, 26: 783-793.
- [5] Trias, R., Baneras, E., Badosa, L. and E., Montesinos, (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against food borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 50-60
- [6] Galvez, A., Abriouel, H. and N., ben Omar (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food microbiology*, 120: 51-70.
- [7] Charlier, C., Cretenet, M., Even, S. and Y., Le Loir, (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 30-39.
- [8] Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G. and K.P., Koutsoumanis (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food research International*, 43 (10): 2402-2408
- [9] Gandhi, M., and M.L., Chikindas, (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food microbiology*, 113: 1-15
- [10] Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A. and H., de Valk (2008). Increasing incidence of Listeriosis in France and other european countries. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 734-740
- [11] Millet, L., Saubusse, M., Didienne, R., Tessier, L. and M.C., Montel, (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (1): 105-114
- [12] Ribeiro Neunlist, M., Ralazamahaleo, M., Cappelier, J.-M., Besnard, V., Federighi, M., and F., Leroi, (2005). Effet of alting and cold-smoking process on the culturability, viability, and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. *Journal of Food Protection*, 68 (7): 85-91
- [13] Lehrke, G., Hernaez, L., Mugliaroli, S.L., von Staszewski, M. and R.J., Jagus, (2011). Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural antimicrobials. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (4): 984-991
- [14] Abo-Amer, A.E., El-Deep, B.A. and A.D. Altalhi (2008). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AA135. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, 67: 36-40
- [15] Cheigh, C.I., Choi, H.J., Park, H., Kim, S.B., Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K. and Y.R., Pyun, (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like production bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95: 225-235
- [16] A.F., Jozala, de Lencastre Novaes, L.C., Cholewa, O., Moraes, D. and T.C., Vessoni Penna, (2005). Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African Journal of Biotechnology*, 4 (3): 262-265
- [17] Chandrapati, S. and D.J., O'Sullivan, (1998). Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology*, 63: 229-233
- [18] Liu, X., Chung, Y.-K., Yang, S.-T. and Yousef, A.E., (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*, 40: 13-24
- [19] Meghrou, J., Huot, E., Quittelier, M., and H., Petitdemange, (1992). Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Research in Microbiology*, 143: 879-890
- [20] Li, C., Bai, J., Cai, Z., and F., Ouyang, (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 93: 27-34
- [21] Mota-Meira, M., Lapointe, G., Lacroix, C., and Lavoie, M.C. (2000). MICs of mutacin B-Ny266, Nisin A, Vancomycin, and Oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (1): 24-29
- [22] McAuliffe, O., Ross, R.P., and Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 285-308



- [23] Todorov, S.D., Prevost, H., Lebois, M., Dousset, X., Leblanc, J.G. and B.D.G.M., Franco, (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)-from isolation to application: 1. Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44 (5): 1351-1363
- [24] Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C. and M.C., Lavoie, (2001). Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a nisin or a lantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (10): 322-331.
- [25] Garcia-Almandarez, B.E., Carr, K.O.I., Martin, S.E., Guerrero-Legaretta, I., and C., Regalado, (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19: 670-680
- [26] Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N. and A.L.B., Perna (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews* 4: 124-140.
- [27] Guinane, G.M., Cotter, P.D., Hill, C. and R.P., Ross, (2005). Microbial solutions to microbial problems; lactic acid bacteria bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1316-1325

Résumé

Parmi les différentes méthodes de lutte contre les microorganismes pathogènes et/ou altérants en agroalimentaire, l'utilisation de bactéries lactiques (LAB) bioprotectrices s'avère être un outil prometteur pour la préservation des aliments. Ce travail de thèse collaboratif, entre l'équipe PAPC (AgroSup Dijon, Université de Bourgogne) et le laboratoire BioDyMIA (Université Lyon1-Isara Lyon), concerne l'étude de systèmes bioprotecteurs immobilisant des cellules entières de LAB dans une matrice polymérique d'alginate de sodium et de caséinate de sodium pour une activité ciblée contre *Listeria* spp. Dans un premier temps, la méthodologie mise en œuvre a consisté à sélectionner des souches de LAB bioprotectrices sur la base de leur activité antimicrobienne évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé contre trois souches de *Listeria* spp. Quatre souches sur 19 ont ainsi été sélectionnées. Une caractérisation partielle des métabolites antimicrobiens produits par ces 4 souches a ensuite été réalisée en appliquant des traitements thermiques et enzymatiques aux surnageants de culture correspondants pour évaluer si ces traitements altéraient l'activité des métabolites antimicrobiens présents. Une purification et une identification partielle des actifs antimicrobiens de nature peptidique ont été réalisées uniquement pour la souche d'intérêt principale : *Lactococcus lactis* LAB3. Dans un second temps, une formulation de la matrice polymérique d'immobilisation des LAB sélectionnées a été choisie en réalisant le diagramme de phases du système aqueux alginate de sodium/caséinate de sodium : 1,5 % (m/m) d'alginate de sodium / 4 % (m/m) de caséinate de sodium / 20 % (m/m) bouillon MRS. Cette formulation a permis d'obtenir une matrice composée d'une phase continue riche en alginate et d'une phase dispersée riche en caséinate dans laquelle les cellules de LAB se localisent préférentiellement d'après les observations en microscopie de fluorescence confocale à balayage laser. Suite à l'inclusion des cellules de LAB dans ces matrices liquides et gélifiées d'alginate seul et d'alginate/caséinate, leur cultivabilité et leur activité anti-*Listeria* ont été suivies à 30°C pendant 12 jours. Ceci a révélé que la cultivabilité et l'activité antimicrobienne des cellules de LAB se maintiennent à des niveaux plus élevés dans les matrices d'alginate/caséinate que dans celles uniquement à base d'alginate. Ces matrices à base d'alginate et de caséinate apparaissent donc comme un système prometteur pour l'immobilisation de LAB bioprotectrices. Leur intérêt pour l'inclusion de LAB a pu être corrélé à leur viabilité et à la structure composite de cette matrice à base de protéines qui favoriserait la production et la libération des métabolites antimicrobiens.

Mots-clés : Bactéries lactiques, biopréservation, confinement, séparation de phase, caséinate de sodium, alginate de sodium, gel, cultivabilité, activité anti-*Listeria*.

Abstract

Among the various methods to control foodborne pathogenic and/or food spoilage microorganisms in food chain, bioprotective lactic acid bacteria (LAB) appear to be promising tools for food biopreservation. This collaborative study, between PAPC (Agrosup Dijon, University of Burgundy) and BioDyMIA (University Lyon1-Lyon Isara) laboratories, concerned the development of sodium alginate/sodium caseinate polymeric matrices intended to entrap LAB cells selected for their anti-*Listeria* spp. activity. First, 4 LAB strains from 19 LAB strains were selected for their anti-*Listeria* spp. activity: this screening was performed by the method of agar diffusion against three *Listeria* spp strains. Then, antimicrobial metabolites produced by the selected LAB strains were partially characterized by assessing the effect of various thermal and enzymatic treatments on the anti-*Listeria* spp. activity of their culture supernatants. A partial purification and identification of antimicrobial active peptides produced by the main strain of interest (*Lactococcus lactis* LAB3) was also performed. A composition of the polymer matrix has been selected by performing the phase diagram of sodium alginate/sodium caseinate system: 1.5% (w/w) sodium alginate / 4% (w/w) of caseinate sodium / 20% (w/w) MRS broth. This formulation provides a rich alginate continuous phase and a rich caseinate dispersed phase in which LAB cells localize according to the study by confocal microscopy. LAB cells were immobilized in liquid and gelled matrices of alginate and alginate/caseinate. Culturability and anti-*Listeria* activities were measured during a storage at 30°C for 12 days. The alginate/caseinate matrices were more effective in better maintaining LAB cells cultivability and their antimicrobial activity than alginate matrix. This effectiveness seemed correlated with cell viability and the dispersion-like structure of the protein-based system which enhance production and release of antimicrobial metabolites. Thus, this type of polymeric matrix appeared as a promising immobilization system of bioprotective LAB.

Keywords: Lactic acid bacteria, biopreservation, entrapment, aqueous two-phase system, sodium caseinate, sodium alginate, gel, culturability, anti-listerial activity.