

AGROCAMPUS  
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



### Mémoire de Fin d'Études

Année universitaire : 2016-2017

Spécialité : Agronomie

Spécialisation (et option éventuelle) :

Microbiologie Fondamentale et Appliquée

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

# Impact du traitement haute-pression sur une souche de bactérie lactique utilisée comme ferment de biopréservation de produits carnés type jambon

Par : Pauline SABROU

**Soutenu à Rennes le 22 Juin 2017**

**Devant le jury composé de :**

Président : Carlos BLANCO

Enseignant référent : Sophie JAN

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»





**Université de Rennes 1 (U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement)**

**Agrocampus Ouest Centre de Rennes**

Master Sciences, Technologies, Santé : mention Biologie, Agronomie, Santé

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée-MFA



**Impact du traitement haute-pression sur une souche de bactérie lactique utilisée comme ferment de biopréservation des produits carnés type jambon**

Mémoire présenté le : 22 Juin 2017

Par Pauline SABROU

**Stage effectué au sein de**

**l'UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques), Agrosup, Dijon**

## **Présentation technique du stage**

Ce stage de fin d'étude a été réalisé dans le cadre du Master Sciences, Technologies, Santé spécialité MFA pour l'année universitaire 2016-2017.

Le sujet choisi est l'étude de l'impact d'un traitement haute-pression sur une souche de bactérie lactique utilisée comme ferment de biopréservation de produits carnés type jambon.

Le stage a été réalisé par Pauline SABROU, accueillie au laboratoire de l'UMRPAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques) à Agrosup Dijon (1 Esplanade Erasme, Bâtiment Epicure Aile Nord, 21000 Dijon). Le travail a été coordonné par Dr SIMONIN Hélène.

Le stage fut réalisé sur une période de 6 mois, du 2 Janvier 2017 au 30 Juin 2017.

## **Remerciements**

Je remercie tout d'abord les directeurs de l'UMR PAM et de l'équipe PMB, Professeurs Laurent Beney et Jean-François Cavin de m'avoir accueilli dans leur structure.

Je remercie mon encadrante, Hélène Simonin pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage au sein de l'équipe du laboratoire.

Je tiens également à remercier Chloé Modugno pour son aide et son soutien tout au long de mon stage.

Enfin je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire pour son accueil chaleureux et sa sympathie tout au long des 6 mois.

# Table des matières

Introduction.....	1
I. Etat de l'art .....	2
1. Problématique de la conservation des produits carnés.....	2
1.1. Microbiologie de la viande et des produits carnés.....	2
1.2. Le besoin de solutions innovantes pour la conservation des produits carnés.....	2
2. Le principe de biopréservation.....	3
2.1. Qu'est-ce que la biopréservation ? .....	3
2.2. Les bactéries lactiques, candidats idéals.....	3
3. Les bactériocines.....	4
3.1. Généralités sur les bactériocines et classification.....	4
3.2. Exemple de la nisine utilisée comme modèle d'étude.....	5
4. Le traitement haute-pression.....	6
4.1. Impact du traitement HP sur les bactéries .....	6
4.2. Impact des HP sur les spores .....	7
5. Combinaison des traitements HP et de la biopréservation.....	8
II. Matériel et méthodes.....	9
1. Composition des milieux utilisés pour la croissance et le dénombrement des micro-organismes.....	9
2. Suivi de croissance de <i>L. lactis</i> BS30 et production de molécules antimicrobiennes .....	9
2.1. Suivi de croissance par lecture de DO et dénombrement .....	9
2.2. Evaluation de la production de nisine au cours de la croissance .....	10
3. Préparation de spores de <i>B. subtilis</i> PS533 .....	11
4. Application d'un traitement HP sur les bactéries.....	12
5. Comportement des bactéries lactiques en co-culture avec une flore indésirable.....	12
5.1. Cas d'une inoculation à $10^6$ UFC/mL et $10^6$ spores/mL sans traitement HP .....	12
5.2. Cas d'une inoculation à $10^7$ UFC/mL et $10^4$ spores/mL avec traitement HP dans différentes conditions de culture.....	13
III. Résultats et discussion .....	14
1. Effet antagoniste de <i>L. lactis</i> BS30.....	14
1.1. L'application d'un traitement HP affecte la croissance bactérienne .....	14
1.2. Le traitement HP affecte aussi la production de nisine de la souche lactique.....	15
2. Comportement des bactéries lactiques en co-culture avec une flore indésirable, à inoculum égaux .....	16

2.1. Sans traitement HP, <i>L. lactis</i> devient la flore majoritaire et <i>B. subtilis</i> reste sous forme sporulée.....	16
2.2. La quantité de nisine produite diffère de celle détectée en culture simple .....	19
3. Comportement des bactéries lactiques en co-culture avec une flore indésirable, à inoculum différents, après traitement HP .....	20
3.1. En milieu jambon simple, la croissance de la flore sporulée n'est pas affectée.....	20
3.2. En milieu jambon additionné de nisine, la croissance de la flore sporulée est inhibée ...	22
Conclusion .....	24
BIBLIOGRAPHIE .....	26

## Liste des abréviations

- **ANR** : Agence Nationale de Recherche
- **BLacHP** : Bactéries lactiques et Haute-Pression
- **CSPs** : Cold Shock Proteins
- **DPA** : acide dipicolinique
- **EFSA** : European Food Safety Agency
- **FAO** : Food and Agriculture Organization of the United States
- **FDA** : Food and Drug Administration of the United States
- **HP** : Haute-pression
- **MES** : 2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid)
- **SASPs** : Small Acid Soluble Proteins
- **UFC** : Unité Formant Colonie
- **WHO** : World Health Organization



# Liste des illustrations

## Figures

**Figure 1.** Schéma du mode d'action de la nisine sur le lipide II (p 5)

**Figure 2.** Schéma de la structure d'une spore (p 7)

**Figure 3.** Courbe de la gamme étalon de nisine représentant l'activité de la solution (en UI/mL) en fonction du diamètre des halos d'inhibition (en mm), réalisée en milieu jambon modèle (p 11)

**Figure 4.** Evolution de la DO à 600nm en fonction du temps d'une culture de *L. lactis* BS30 en milieu jambon sans traitement HP (bleu foncé) ou après traitement HP (bleu clair) (p 14)

**Figure 5.** Quantification de la nisine au cours du temps dans une culture de *L. lactis* BS30 en milieu jambon sans traitement HP (bleu foncé) ou après traitement HP (bleu clair) (p 15)

**Figure 6.** Evolution des populations de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 mises en co-culture en milieu jambon (A) ou en milieu jambon additionné de 50 UI/mL de nisine (B) (p 16)

**Figure 7.** Evolution des populations de spores (bleu foncé) et de cellules germées (bleu clair) de *B. subtilis* PS533 dans une culture simple (A) ou en co-culture avec *L. lactis* BS30 (B) en milieu jambon, après traitement thermique à 80°C pendant 10 min. (p 18)

**Figure 8.** Quantification de la nisine présente dans une co-culture de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 en milieu jambon, sans traitement HP (p 19)

**Figure 9.** Evolution des populations de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 mises en cultures simples sans traitement HP (A) ou en co-culture après traitement HP (B) en milieu jambon (p 20)

**Figure 10.** Evolution des populations de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 mises en cultures simples sans traitement HP (A) ou en co-culture après traitement HP (B) en milieu jambon additionné de 50 UI/mL de nisine (p 22)

## Tableaux

**Tableau 1.** Composition des milieux de culture utilisés (p 9)

**Tableau 2.** Milieux de culture et conditions d'incubation pour le dénombrement de *L. lactis* ou *B. subtilis* en cultures témoins et co-culture (p 12)



## Introduction

Le thème de ce stage s'inscrit dans le projet ANR BLacHP, mené en coopération avec plusieurs partenaires académiques et industriels. L'objectif de ce projet est de développer une nouvelle méthode de conservation des produits carnés réfrigérés, associant deux procédés qualifiés de « doux ». D'une part, il s'agit d'utiliser des micro-organismes pouvant constituer une flore protectrice pour l'aliment grâce à leurs caractéristiques, notamment leur capacité à produire des molécules antimicrobiennes. Il s'agit de biopréservation. D'autre part, l'utilisation d'un procédé de pasteurisation tel que le traitement haute-pression (HP) est envisagée car moins altérant pour l'aliment que les traitements thermiques appliqués actuellement. La combinaison entre biopréservation et HP permettrait ainsi d'obtenir un mode de conservation moins agressif pour l'aliment.

En effet, les industriels de l'agro-alimentaire doivent prendre en compte la demande des consommateurs qui tend à l'achat d'aliments contenant moins de conservateurs et ayant subi moins de traitements physiques. Assurer la qualité microbiologique des aliments est essentiel, particulièrement celle des produits carnés. Etant hautement périssables, ils peuvent être sujets à des contaminations dues à des bactéries pathogènes ou d'altération. Certaines flores indésirables des genres *Bacillus* et *Clostridium* sont par ailleurs potentiellement présentes sous forme sporulée.

Le stage s'est essentiellement basé sur l'utilisation d'une souche de bactérie lactique de biopréservation en combinaison avec un traitement HP. La bactérie est cultivée dans un milieu de culture formulé pour mimer les principales caractéristiques d'un jambon cuit supérieur. Tout d'abord l'effet des HP a été étudié sur cette bactérie mais aussi sur sa production de molécules antibactériennes. Pour cela, des suivis de cultures simples avant et après traitement HP ont été réalisés. L'évaluation de la production d'agents antimicrobiens a été effectuée par une méthode de diffusion en gélose. Ensuite cette souche a été mise en présence d'une flore bactérienne indésirable. Cette co-culture a également été traitée en HP.

Dans une première partie, nous effectuerons un état de la littérature autour du contexte présenté dans cette introduction. Dans une seconde partie seront présentées les méthodes mises en œuvre au cours du stage. Les résultats obtenus et les discussions seront mis en avant dans une dernière partie.

# I. Etat de l'art

## 1. Problématique de la conservation des produits carnés

### 1.1. Microbiologie de la viande et des produits carnés

Le respect des règles d'hygiène en industrie agro-alimentaire est strict et il faut que le consommateur puisse utiliser des produits dont la qualité microbiologique est contrôlée. Entre autres, la préparation des produits carnés doit être réalisée avec précautions (*Garriga et al. 2002*). La microbiologie de la viande est complexe. Elle dépend de nombreux facteurs intrinsèques (nutriments, pH, pouvoir tampon de l'aliment,  $a_w$ , structure,...) et/ou extrinsèques (traitement et stockage de la viande notamment, en jouant sur les paramètres température et présence d'oxygène). C'est pourquoi chaque étape de préparation de la viande doit être maîtrisée, du transport des animaux à la mise sur le marché du produit (*Castellano et al., 2008*). Les produits carnés peuvent être contaminés par des bactéries indésirables ou pathogènes dont plusieurs espèces comme *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus* (*Woraprayote et al., 2016*). Les contaminations dues aux bactéries capables de sporuler, essentiellement celles des genres *Bacillus* ou *Clostridium*, représentent un risque majeur du fait de la résistance des spores aux traitements de décontamination (*Black et al., 2008 ; Sarker et al., 2013 ; Zhang & Mittal., 2008*). De plus, certaines bactéries sporulées sont psychrotolérantes et peuvent se développer aux températures de réfrigération des aliments. Des espèces du groupe *Bacillus cereus* et *C. botulinum* sont ainsi capables de se développer dans des produits stockés au frais (*Guinebretière et al. 2008*). Enfin, d'autres espèces parmi les genres *Clostridium* ou *Bacillus* sont identifiées en tant que flore altérante (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*,...) (*Black et al., 2008 ; Sarker et al., 2013*). C'est pourquoi les industriels ajoutent des conservateurs limitant le développement des micro-organismes pathogènes et indésirables, en particulier les formes sporulées (*Di Gioia et al., 2016*).

### 1.2. Le besoin de solutions innovantes pour la conservation des produits carnés

Dans la plupart des produits carnés et notamment dans le jambon, les nitrites jouent le rôle d'antimicrobiens (*Di Gioia et al., 2016*). Ils jouent aussi un rôle organoleptique, en particulier pour le jambon, puisque c'est l'interaction des nitrites avec l'hémoglobine de la viande qui permet d'obtenir la couleur rose caractéristique de ce produit (*Froehlich et al., 1983*). Cependant, les nitrites peuvent induire la formation de composés carcinogènes nommés nitrosamines (*Di Gioia et al., 2016 ; Woraprayote et al., 2016*). C'est pourquoi il existe une demande croissante des consommateurs pour la production d'aliments contenant moins d'additifs. Afin de respecter cette demande, les recherches se sont orientées vers des alternatives de conservation des aliments telles que la biopréservation (*Castellano et al., 2008 ; Sarker et al., 2013*). La volonté des consommateurs

est aussi d'appliquer moins de traitements susceptibles d'altérer l'aliment, comme ce peut être le cas avec les traitements thermiques réalisés habituellement. L'utilisation de procédés HP est en progression depuis peu et apparaît comme une alternative intéressante. En effet, la température ( $T^\circ$ ) appliquée lors du traitement HP au niveau industriel est modérée, permettant ainsi de conserver les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits tout en assurant leur sécurité microbiologique (*Rendueles et al., 2011*).

## **2. Le principe de biopréservation**

### **2.1. Qu'est-ce que la biopréservation ?**

La biopréservation repose sur l'utilisation d'une flore microbienne protectrice et/ou des métabolites qu'elle produit afin d'augmenter la durée de conservation des aliments et assurer leur sécurité microbiologique de manière plus naturelle que les procédés déjà existants (*Stiles., 1996*). Le concept de biopréservation est intéressant car il répond au principe dit « des barrières » (*Leistner & Gorris., 1995*). Ce principe correspond à l'utilisation de facteurs déjà existants au niveau du produit ( $a_w$ ,  $T^\circ$ , ...) et de nouvelles techniques de préservation dans le but de créer de nouvelles méthodes de conservation des aliments afin d'éliminer plus efficacement les flores pathogènes et indésirables (*Castellano et al., 2008*). Les bactéries de biopréservation utilisées à un niveau industriel doivent répondre aux critères suivants : être faciles à cultiver autant dans un milieu de culture que dans l'aliment en question, survivre lors du stockage des aliments, être compétitives avec les autres flores, inhiber efficacement les micro-organismes indésirables et pathogènes et ne pas altérer les qualités organoleptiques du produit (*Castellano et al., 2008*). Dans le cas du procédé de biopréservation, la flore protectrice utilisée va être essentiellement constituée de bactéries lactiques, car celles-ci possèdent plusieurs propriétés répondant à ces différents critères.

### **2.2. Les bactéries lactiques, candidats idéals**

Les bactéries lactiques sont utilisées dans les procédés de fermentations alimentaires depuis longtemps comme par exemple pour la fabrication du fromage développée il y a des milliers d'années. D'autres types de produits fermentés font intervenir les bactéries lactiques tels que le pain, les yaourts, certains produits carnés comme la saucisse sèche, etc (*Ross et al., 2002*). La fermentation repose sur l'utilisation de glucides par les micro-organismes qui sont capables de les transformer en divers composés selon leur métabolisme fermentaire. Certains de ces composés finaux ont une action antimicrobienne. Les acides organiques (acide lactique, acide propionique, ...), l'éthanol ou le peroxyde d'hydrogène par exemple, vont limiter la croissance des flores pathogènes et indésirables dans l'aliment (*Ross et al., 2002*).

D'un point de vue réglementaire, les bactéries lactiques utilisées dans les procédés de fermentation (ainsi que celles utilisées pour la biopréservation) sont considérées comme non nuisibles à la

consommation humaine. Elles possèdent le statut GRAS (Generally Recognised As Safe) et QPS (Qualified Presumption of Safety) délivrés par la US FDA et l'EFSA (*Castellano et al., 2008 ; Di Gioia et al., 2016*). Lors du stockage des aliments, les bactéries lactiques constituent une flore compétitive limitant la croissance des pathogènes et cette caractéristique est recherchée dans le cadre de la biopréservation (*Castellano et al., 2008*). Cependant, cet aspect compétitif va dépendre de divers paramètres tels que le taux d'inoculation initial des bactéries lactiques dans l'aliment, l'affinité de celles-ci pour les substrats présents, leur taux de croissance, des flores avec lesquelles elles sont en compétition et aussi de leur capacité à produire des métabolites antimicrobiens (*Di Gioia et al., 2016 ; Castellano et al., 2008*). Certaines d'entre elles sont capables de produire des bactériocines jouant un important rôle antibactérien.

### 3. Les bactériocines

#### 3.1. Généralités sur les bactériocines et classification

Les bactériocines sont de petits peptides antimicrobiens produits par les bactéries et dirigés contre d'autres bactéries, généralement d'espèces proches (*Cotter et al., 2005 ; Tagg et al., 1976*). De nombreuses bactériocines sont actives contre les bactéries pathogènes, plus particulièrement les Gram positives. Elles représentent donc un intérêt important pour la biopréservation (*Samarzija et al., 2001*). Elles ne sont par contre pas actives contre les bactéries à Gram négatif, ces dernières étant protégées par leur membrane externe (*Castellano et al., 2008*). Leur mode d'action repose principalement sur la dépolarisation membranaire et l'arrêt de synthèse de la paroi cellulaire (*Ross et al., 2002*). Elles tolèrent différentes gammes de pH ou T° du fait de leurs structures variées (*Tagg et al., 1976*). Les bactériocines ont été initialement classées en 3 groupes principaux comprenant la famille des « lantibiotiques » (classe I), les petits peptides non modifiés (classe II) et les protéines thermolabiles (classe III) (*Klaenhammer., 1993 ; Ross et al., 2002*). Aujourd'hui, cette classification est discutée. De nouveaux groupes de bactériocines ont été établis dont deux classes principales (*Cotter et al., 2005 ; Woraproyote et al., 2016*) :

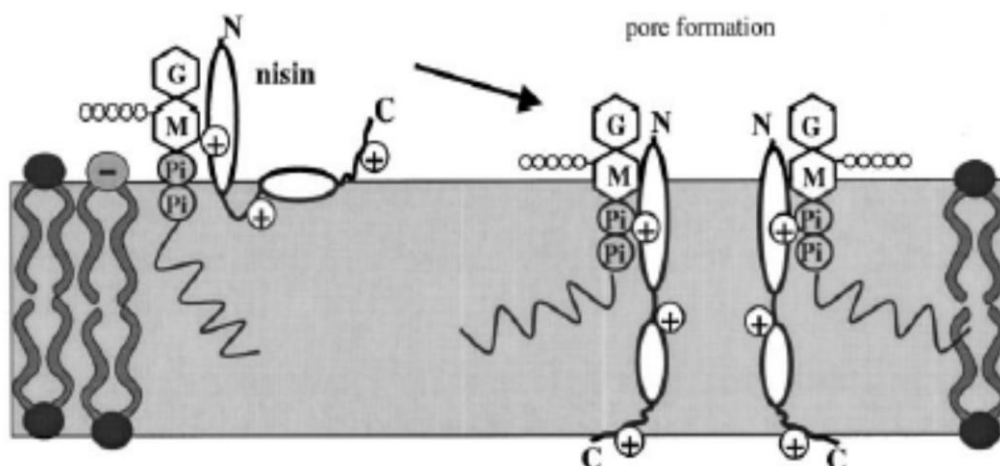
- ➔ Classe I = « lantibiotiques » : petits peptides <5kDa ayant subi des modifications post-transductionnelles et présentant des résidus particuliers (lanthionine ou 3-méthyllanthionine).
- ➔ Classe II = petits peptides <10kDa, thermostables et n'ayant pas subi de modifications post-traductionnelles. Cette classe est subdivisée en 4 sous-groupes :
  - IIa : « bactériocines similaires à la pédiocine », à activité anti-*Listeria*
  - IIb : « bactériocines à deux peptides », ayant besoin de deux peptides différents à concentration équimolaire pour exercer un effet antimicrobien optimal
  - IIc : bactériocines à structure cycliques particulières

- IId : « peptides linéaires différant de la pédiocine », bactériocines sec-dépendantes, bactériocines actives directement après traduction

Globalement, les bactériocines possèdent diverses caractéristiques intéressantes pour leur application en agro-alimentaire. Elles ne vont pas altérer les qualités organoleptiques des aliments car elles sont incolores, inodores et n'ont pas de goût particulier. Enfin, ce sont des molécules non toxiques et dégradées par les protéases du tube digestif. Elles n'ont donc aucun impact sur la flore microbienne digestive (*Woraprayote et al., 2016*).

### 3.2. Exemple de la nisine utilisée comme modèle d'étude

La nisine est une bactériocine produite par des souches de *Lactococcus lactis*. Il s'agit de la seule bactériocine dont l'utilisation en tant que conservateur ait été autorisée par la FAO/WHO (*Ross et al., 2002*). Elle agit au niveau de la membrane bactérienne en interagissant avec une molécule précurseur de la formation du peptidoglycane, le lipide II (**Figure 1**). Le complexe ainsi constitué va entraîner la formation de pores dans la membrane, provoquant la fuite d'éléments essentiels à la survie cellulaire (*Ross et al., 2002 ; Woraprayote et al., 2016*).



**Figure 1. Schéma du mode d'action de la nisine sur le lipide II**  
(*Wiedemann et al., 2001*)

Il semblerait par ailleurs que la nisine ait une action sur les spores bactériennes dès que celles-ci se mettent à germer en empêchant l'initiation de leur métabolisme (*Gut et al., 2008*). Les souches de *L. lactis* productrices de nisine sont insensibilisées via l'expression de gènes de résistance spécifiques (*Trmčić et al., 2010*). Il existe deux systèmes permettant à *L. lactis* d'être immunisé. Le premier repose sur la synthèse d'une lipoprotéine capable de séquestrer la nisine. Le second repose sur un complexe protéique jouant le rôle de transporteur (*Lubelski et al., 2008*). L'activité de la nisine peut être modifiée selon le pH.

La nisine est beaucoup plus stable à pH faible, certains de ces résidus déshydrogénés pouvant interagir avec des ions nucléophiles tels que les ions  $H^+$  (Liu & Hansen., 1990). Des études menées sur *L. lactis* ont permis de montrer que la production de nisine suivait la production de biomasse. Le pic de production a ainsi été observé en fin de phase exponentielle, lorsque le taux de biomasse atteint son maximum. Lorsque les cellules entrent en phase stationnaire la production de nisine s'arrête (De Vuyst & Vandamme., 1992).

#### **4. Le traitement haute-pression**

##### **4.1. Impact du traitement HP sur les bactéries**

Le traitement HP est envisagé comme une alternative aux traitements couramment appliqués pour stabiliser les aliments (traitements thermiques notamment). L'application de HP est moins agressive pour le produit et affecte peu ses qualités organoleptiques (Han et al., 2011). Le traitement se fait en chambre de compression selon un barème temps/température/pression déterminé. Le fluide transmetteur de pression est l'eau et la pression appliquée à l'aliment est dite isostatique (la même pression est appliquée uniformément en tout point de l'aliment). Les températures utilisées sont généralement modérées comparées à celles des traitements thermiques traditionnels (Lerasle et al., 2012). Ce type de traitement va affecter les bactéries aux niveaux morphologique et/ou membranaire. Les HP vont aussi avoir un impact sur le matériel génétique des bactéries et sur la machinerie enzymatique nécessaire à leur croissance (enzymes de réplication et transcription, ribosomes) (Malinowska-Pańczyk et al., 2011). Les populations de bactéries sous forme végétative vont ainsi être inactivées de manière totale ou partielle. Le degré d'inactivation dépend de nombreux facteurs tels que le type bactérien, la morphologie des bactéries, la température et la phase de croissance dans laquelle elles se trouvent. De manière globale, les effets d'un traitement HP dépendent des multiples conditions auxquelles sont exposées les bactéries. Les paramètres de traitement et les caractéristiques du produit sont aussi à considérer (Lerasle et al., 2012).

L'inactivation microbienne augmente avec la pression appliquée et la durée de traitement (Lerasle et al., 2012). Cependant, l'inactivation totale des micro-organismes n'est jamais atteinte. On parle d'un phénomène de « tailing » (Smelt J.P.P.M., 1998).

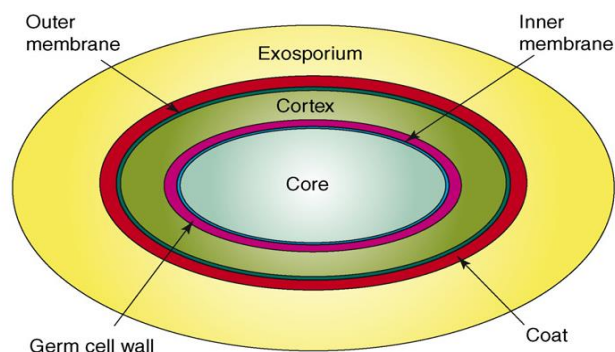
Par rapport à la température de traitement appliquée, il existe une valeur pour laquelle les micro-organismes présentent une résistance optimale aux HP. Souvent il s'agit d'une température proche de la température ambiante ( $\sim 20^\circ C$ ). Cependant au niveau industriel les traitements sont réalisés pour des températures environnant les  $15^\circ C$  (Lerasle et al., 2012). Les paramètres physico-chimiques des produits tels que l' $a_w$ , le pH, la composition jouent un rôle significatif dans l'efficacité d'inactivation des micro-organismes. Les traitements sont moins efficaces pour des  $a_w$  autour de 0,92.



Pour le pH, il existe une valeur pour laquelle les bactéries sont résistantes aux HP et leur survie est maximale (Lerasle et al., 2012). Selon sa composition, le milieu peut conférer un effet protecteur plus ou moins important aux micro-organismes. Celui du saccharose et des sels a déjà été démontré, notamment pour *L. lactis* (Molina-Höpner et al., 2004). Mais c'est principalement la complexité du milieu qui participe à la protection des micro-organismes, en leur fournissant des composés essentiels à la reprise de croissance (Lerasle et al., 2012).

#### 4.2. Impact des HP sur les spores

Les bactéries sporulent sous l'influence de divers signaux environnementaux incluant entre autres le manque de nutriments dans le milieu ou la densité cellulaire (Sarker et al., 2013). La forme sporulée leur permet de résister sur de longues périodes, bien mieux que lorsqu'elles sont sous forme végétative. De cette façon, elles sont protégées contre différents stress tels que l'oxydation, les fortes températures, les variations de pH, etc (Gut et al., 2011). La spore est formée de plusieurs couches (**Figure 2**). La couche la plus extérieure ou exosporium forme une barrière constituée de protéines dont le rôle précis est peu connu. Elle n'est pas présente chez toutes les espèces de bactéries, comme chez *Bacillus subtilis* qui en est dépourvu (Setlow P., 2007). La couche inférieure, nommée manteau, est formée de protéines fortement réticulées. On distingue ensuite une couche de peptidoglycane, le cortex. La spore possède aussi deux membranes plasmiques. La membrane externe, située entre le manteau et le cortex et la membrane interne, située en dessous du cortex. Cette dernière participe à la résistance des spores, du fait, entre autres, de sa faible perméabilité. Elle protège ainsi l'ADN de dommages causés par des molécules chimiques (Setlow P., 2007). Enfin, le cœur de la spore est le compartiment protégeant les éléments essentiels de la bactérie comme l'ADN et les ribosomes (Zhang & Mittal., 2008). Il s'agit d'une partie peu hydratée, du fait de la présence d'une forte quantité d'acide dipicolinique (DPA) lié à des ions calcium  $Ca^{2+}$ . Cette faible quantité d'eau favorise la liaison de petites protéines nommées SASPs (Small Acid Soluble Proteins) à l'ADN. Ces dernières jouent un rôle particulièrement important de protection du matériel génétique (Sarker et al., 2013).



**Figure 2. Schéma de la structure d'une spore (Setlow et al., 2007)**

Les formes bactériennes sporulées sont plus résistantes à la pression du fait de leur structure, mais cette résistance varie selon les espèces et les souches. A l'heure actuelle, les traitements HP ne permettent pas leur inactivation directe (*Sarker et al., 2013*). Cependant, il serait possible d'éliminer les formes sporulées en les faisant germer. La germination des spores peut être induite pour de faibles pressions, entre 100 et 300 MPa (*Black et al., 2008*). Dans ce cas, des récepteurs de germination sont activés par le traitement HP. Cela induit la libération de complexes DPA-Ca<sup>2+</sup> du cœur de la spore d'une part, et l'activation d'enzymes lytiques qui vont dégrader le cortex d'autre part. Pour de plus hautes pressions, entre 400 et 800 MPa, la germination est directement induite par la libération de DPA via la modification de configuration de canaux mécano-sensibles localisés dans la membrane interne des spores (*Sarker et al., 2013*). Le traitement HP peut être utilisé en combinaison avec d'autres traitements, telle que l'utilisation des bactériocines, afin de mieux contrôler les contaminations microbiennes, particulièrement celles dues aux spores. (*De Oliveira et al. 2015*).

### **5. Combinaison des traitements HP et de la biopréservation**

Dans le cadre du projet, l'hypothèse principale repose sur le fait que par la biopréservation, en combinaison avec un traitement HP, permettrait de contrôler la croissance des bactéries sous forme sporulée. Le traitement HP serait réalisé afin d'initier la germination des spores, comme expliqué dans la partie précédente. Par la biopréservation, i.e. l'utilisation d'une flore lactique productrice de bactériocine, en l'occurrence de nisine, il serait possible d'éliminer les formes végétatives générées. Il existe peu de littérature à ce sujet, mais certains auteurs ont déjà montré que la nisine était capable d'agir sur les spores très rapidement après l'initiation de la germination et les empêchait de devenir métaboliquement actives (*Gut et al., 2008*). D'autres auteurs ont pu montrer qu'il existait un effet synergique entre le traitement HP et la présence de nisine dans le milieu pendant le traitement (tests effectués sur du lait). Les HP seraient utilisées en tant que traitement pro-germinant et la nisine agirait pendant les stades précoces de la germination des spores (*Black et al., 2008*). C'est principalement autour de cette base que ce sont construites les missions menées durant le stage.

Dans ce contexte, deux objectifs principaux se sont dégagés. Tout d'abord la première partie du stage a consisté à étudier l'effet antagoniste d'une souche de bactérie lactique utilisée comme flore de biopréservation, *Lactococcus lactis*. Pour cela, la production de nisine a été évaluée dans une culture de cette bactérie ayant subi ou non un traitement HP. Le deuxième objectif a été d'analyser le comportement de cette souche lorsqu'elle se trouve en co-culture avec une flore indésirable. Dans notre cas, une flore de type sporulée et non pathogène est utilisée, *Bacillus subtilis*. Comme précédemment, l'analyse a été effectuée sur des co-cultures ayant subi un traitement HP ou non.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Composition des milieux utilisés pour la croissance et le dénombrement des micro-organismes

Ci-après le **Tableau 1** présente les milieux de culture choisis pour *L. lactis* et *B. subtilis*, la composition d'un milieu élaboré pour la sporulation de *B. subtilis* ainsi que celle du milieu utilisé pour la souche sensible à la nisine (méthode de détection présentée en section II.2.2.2.).

**Tableau 1. Composition des milieux de culture utilisés**

<b>Milieu jambon modèle*</b>	NaCl 17,6 g/L ; Peptone from porcine heart 10 g/L ; Extrait de levure 5 g/L ; Lactose 2,32 g/L; Saccharose 0,7 g/L Le pH du milieu est ajusté à 6,1 avant autoclavage
<b>Milieu M17 pour dénombrement de <i>L. lactis</i> BS30</b>	Tryptone 2,5 g/L ; Meat peptone 2,5 g/L ; Soya peptone 5 g/L ; Yeast extract 2,5 g/L ; Meat extract 5 g/L ; Sodium glycerophosphate 19 g/L ; Magnesium sulfate 0,25 g/L ; Acide ascorbique 0,5 g/L ; Lactose 5 g/L ; Agar 15 g/L (milieu solide uniquement)
<b>Milieu pour <i>Micrococcus luteus</i> DSM1790</b>	Bacteriological peptone 10 g/L ; Bacteriological beef extract 3 g/L ; NaCl 3 g/L ; Extrait de levure 1,5 g/L ; Sucrose 1 g/L ; Agar 15 g/L (pour le milieu solide uniquement) Le pH du milieu est ajusté à 7 avant autoclavage.
<b>Milieu pour sporulation (André et al., 2013)</b>	Extrait de viande 10 g/L ; Extrait de levure 2 g/L ; MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 0,04 g/L ; Agar 15 g/L
<b>Milieu LB + kanamycine pour dénombrement de <i>B. subtilis</i> PS533</b>	LB broth 15 g/L ; Kanamycine 10 µg/mL ; Agar 15 g/L

\*La composition de ce milieu a été définie à partir de celle d'un jambon cuit supérieur par un consortium des partenaires du projet ANR. Elle correspond aux principales caractéristiques physico-chimiques du jambon (pH, a<sub>w</sub>, taux de sucres et de sels) hormis le taux de protéines. Les nitrites ne sont pas ajoutés dans ce milieu, afin de se focaliser uniquement sur l'effet de protection des bactéries lactiques.

### 2. Suivi de croissance de *L. lactis* BS30 et production de molécules antimicrobiennes

#### 2.1. Suivi de croissance par lecture de DO et dénombrement

La souche de bactérie lactique utilisée est conservée en cryotubes à -80°C dans du milieu jambon supplémenté avec 20% de glycérol. Chaque semaine, des isollements sont réalisés sur milieu M17 afin de disposer de colonies bactériennes fraîches et sont incubés 48h à 30°C en aérobie.

Afin de réaliser un suivi de croissance, des pré-cultures de *L. lactis* sont préparées en fioles bafflées. Pour cela, 2-3 colonies isolées sont inoculées dans 50 mL de milieu jambon modèle (**Tableau 1 section II.1.**). Les pré-cultures sont incubées sous agitation orbitale (200 rpm) durant 24h à 30°C. Des cultures sont ensuite préparées en inoculant 1 mL de pré-culture dans 100 mL de milieu jambon en fioles bafflées. Des prélèvements de 1 mL sont réalisés toutes les heures (ou toutes les 2h) et la croissance est suivie par lecture de la densité optique (DO) à 600 nm et étalement sur milieu M17 (**Tableau 1 section II.1.**) pour le dénombrement des UFC réalisé après incubation 24h à 30°C. Chaque mesure est réalisée en triplicat.

## 2.2. Evaluation de la production de nisine au cours de la croissance

La production de nisine est évaluée par application d'une méthode de diffusion en gélose, adaptée de *De Vuyst & Vandamme., (1992)*.

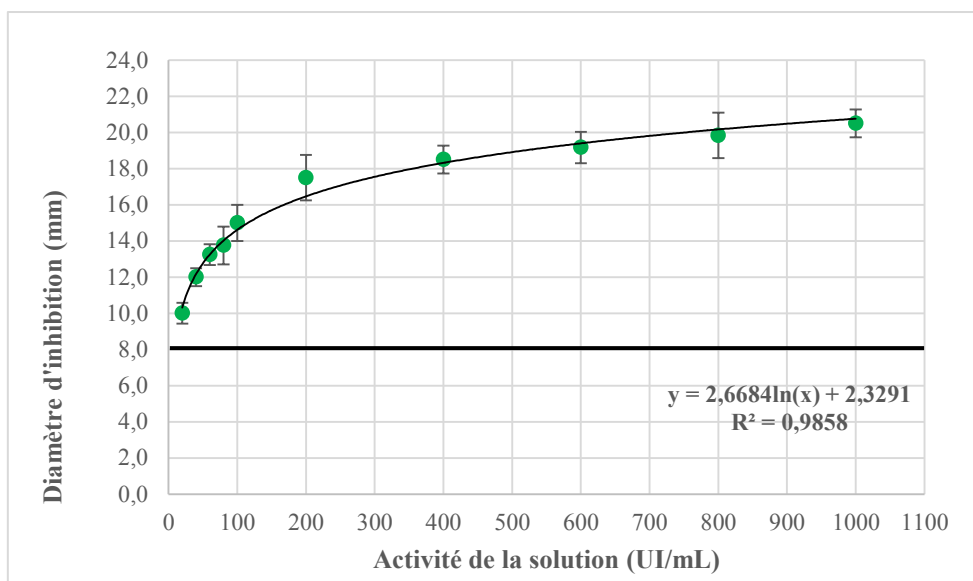
Plus exactement, une pré-culture de *Micrococcus luteus* DSM 1790 est obtenue après 24 h à 30°C sous agitation orbitale (200 rpm) en inoculant 50 mL de milieu pour *Micrococcus* (**Tableau 1 section II.1**) à partir d'une colonie. Cette pré-culture est diluée au 100<sup>ième</sup> dans du milieu frais avant incubation dans les mêmes conditions pour obtenir une culture en phase stationnaire de croissance. La culture obtenue est lavée deux fois dans du PBS par centrifugation (3600 g / 25°C / 10 min).

10 mL de Tween 20 dilué (ratio massique 1 :1 dans de l'eau distillée) et 10 mL de la culture de *M. luteus* diluée au 1/10<sup>ème</sup> (concentration d'environ 10<sup>8</sup> cellules/mL) sont ajoutés au milieu *Micrococcus* Agar pour un volume final de 500 mL. Le Tween 20 permet d'aider à la diffusion de la nisine dans le milieu gélosé (*Tramer & Fowler, 1964*). Le milieu est ensuite coulé et lorsque la gélose est prise en masse, les boîtes sont laissées au frigo pendant 1h. Des puits sont ensuite formés à partir d'un cône de pipette (diamètre 0,8 mm).

La nisine étant excrétée dans le milieu par *L. lactis*, 1 mL de culture de bactérie à tester pour sa production de nisine est prélevé et filtré stérilement à 0,2 µm afin de récupérer le surnageant. 50 µL de ce surnageant sont ajoutés dans les puits d'une boîte qui est incubée pendant 24 h à 30°C. Trois puits par répétition sont réalisés dans la gélose. La présence de nisine est révélée par la formation de halos translucides autour des puits. Des tests préalables réalisés au laboratoire avant le début du stage, ont permis de montrer que l'activité antimicrobienne principale était uniquement due à la production de nisine. L'action d'acide organiques, de peroxyde d'hydrogène ou d'autre protéines a donc été écartée. Deux diamètres sur les halos sont mesurés (ceux-ci n'étant pas toujours complètement circulaires, cela permet de faire une moyenne sur les mesures effectuées). Il existe une relation logarithmique entre le diamètre des halos et la concentration en nisine (*Wolf & Gibbons., 1996*).

L'équation (1) a été établie en interne au laboratoire à partir de la courbe Ø (diamètre en mm) = f([nisine]) (**Figure 3**) permettant ainsi de calculer la concentration en nisine :

$$[nisine] = \exp\left(\frac{\varnothing - 2,3291}{2,6684}\right) \quad (1)$$



**Figure 3. Courbe de la gamme étalon de nisine représentant l'activité de la solution (en UI/ml) en fonction du diamètre des halos d'inhibition (en mm), réalisée en milieu jambon modèle.** La gamme de concentrations testée va de 0 UI/mL à 1000 UI/mL. La ligne noire représente la limite de détection de la méthode. Les points représentent la moyenne obtenue et les barres d'erreur représentent l'écart-type standard pour un triplicat.

### 3. Préparation de spores de *B. subtilis* PS533

Un isolement est réalisé sur milieu LB + kanamycine (**Tableau 1 section II.1.**) car la souche utilisée possède un plasmide de résistance à cet antibiotique. Dans une fiole bafflée, 50 mL de milieu LB sont inoculés avec une colonie isolée. Le tout est incubé à 37°C sous agitation orbitale (200 rpm). Lorsque la DO<sub>600</sub> atteint une valeur comprise entre 0,4 et 0,6, 400 µL sont prélevés et étalés sur des boîtes contenant du milieu de sporulation gélosé (**Tableau 1 section II.1.**) puis elles sont incubées à 37°C environ 3 jours. Les spores sont récoltées en ajoutant environ 5 mL d'eau distillée stérile à 4°C sur chaque gélose et en grattant la surface avec un râteau puis sont lavées par centrifugation (3600 g/15 min/4°C) dans de l'eau distillée stérile à 4°C. Afin d'éliminer les éventuelles cellules végétatives les spores sont centrifugées (3600 g/15 min/4°C) et re-suspendues dans de l'éthanol (70% filtré à 0,2 µm). La suspension de spores est maintenue dans ces conditions sous agitation orbital (200 rpm) pendant 1h à 4°C. Deux autres lavages (3600 g/15 min/4°C) à l'eau distillée à 4°C sont ensuite réalisés afin d'éliminer l'éthanol. Un dénombrement sur milieu LB + kanamycine est effectué afin d'évaluer la quantité de biomasse récoltée. Les suspensions de spores sont ensuite conservées à 4°C pendant 5 semaines maximum.

## 4. Application d'un traitement HP sur les bactéries

Les cultures obtenues selon les étapes décrites à la section II.2.2.1. sont lavées (3600 g/25°C/15 min) dans du tampon MES. Le pH de ce tampon est plus stable lors des traitements HP que pour la plupart des tampons utilisés classiquement (*Bruins et al., 2007*). Des échantillons sont ensuite préparés pour le traitement. La culture est aliquotée en volumes de 500 µL dans des pipettes de transfert en plastique qui sont ensuite thermoscellées. Une fois les échantillons prêts, ils sont disposés dans l'enceinte HP (Top industrie) pendant 5 min pour s'adapter à la température du système. La température est fixée à 20°C grâce à un bain marie. La montée en pression est ensuite initiée, à raison de 3 MPa par seconde. Le traitement appliqué est de 500 MPa pendant 5 min à 20°C. Une fois le traitement terminé, les échantillons sont récupérés en tubes 1,5 mL et 1 mL est inoculé dans 100 mL de milieu jambon en fioles bafflées. Les cultures post-traitement HP sont incubées à 30°C sous agitation orbitale (200 rpm). La croissance est suivie par lecture de DO et dénombrement réalisés comme décrit à la section II.2.2.1.

## 5. Comportement des bactéries lactiques en co-culture avec une flore indésirable

### 5.1. Cas d'une inoculation à 10<sup>6</sup> UFC/mL et 10<sup>6</sup> spores/mL sans traitement HP

Pour évaluer l'effet antagoniste de *L. lactis* sur des flores indésirables, des co-cultures ont été réalisées en mettant *L. lactis* en présence de spores de *B. subtilis*. Les micro-organismes ont été inoculés à 10<sup>6</sup> UFC/mL chacun dans 100 mL de milieu jambon (suspension mère de *L. lactis* à 10<sup>8</sup> UFC/mL et suspension mère de spores de *B. subtilis* à 10<sup>9</sup> spores/mL). Les co-cultures ont été incubées à 30°C sous agitation orbitale (200 rpm). En parallèle, des cultures simples de *L. lactis* et *B. subtilis* aussi inoculées à 10<sup>6</sup> cellules/mL dans le milieu jambon ont été réalisées afin de servir de témoins. Un suivi de croissance par dénombrement sur des milieux sélectifs appropriés (**Tableau 2**) a été effectué sur 24h ainsi qu'un suivi de la production de nisine.

**Tableau 2. Milieux de culture et conditions d'incubation pour le dénombrement de *L. lactis* ou *B. subtilis* en cultures témoins et co-culture**

Type de milieu	Aérobic/Anaérobic	Température	Temps d'incubation	Micro-organisme dénombré
M17	Aérobic	30°C	24-48h	<i>L. lactis</i> culture témoin, flore totale co-culture
M17	Anaérobic	30°C	24-48h	<i>L. lactis</i> co-culture
LB + kanamycine	Aérobic	30°C	24h	<i>B. subtilis</i> culture témoin, <i>B. subtilis</i> co-culture

La même expérience a été réalisée en ajoutant 50 UI/mL de nisine dans le milieu de culture. Pour cela, une solution mère de nisine à 50000 UI/mL a été préalablement préparée dans de l'HCl à 0,02M puis filtrée stérilement à 0,2 µm.

A partir de cette co-culture, l'évolution de la population de *B. subtilis* a été analysée au cours du temps. Pour cela, un traitement thermique à 80°C pendant 10 min est appliqué sur 1 mL de co-culture. Ce traitement permet d'éliminer les formes germées de *B. subtilis*. Après traitement, la suspension est diluée en série et un dénombrement est effectué sur milieu LB+kanamycine après incubation à 30°C pendant 24h.

## 5.2. Cas d'une inoculation à 10<sup>7</sup> UFC/mL et 10<sup>4</sup> spores/mL avec traitement HP dans différentes conditions de culture

Les taux d'inoculation testés ici ont été définis par les partenaires du projet ANR de façon à ce que les concentrations cellulaires utilisées soient plus proches de ce qui peut se produire en réalité.

Comme précédemment, des pré-cultures et cultures de *L. lactis* ont été préparées et incubées 13h au lieu de 24h afin de prélever les cellules en début de phase stationnaire.

Les suspensions mères de chaque micro-organisme ont été diluées puis inoculées dans 100mL de milieu jambon tamponné de MES afin d'obtenir les concentrations finales désirées. Les cultures préparées pour le traitement étaient les suivantes : cultures seules de *L. lactis* ou *B. subtilis* servant de témoins et co-cultures *L. lactis/B. subtilis*. Le traitement en HP a été effectué dans une enceinte HP pilote de 5L (Top industrie). Cela a permis de traiter de plus gros volumes qu'avec la chambre HP disponible au laboratoire. Le traitement appliqué était de 500 MPa pendant 5 min, avec un temps de montée en pression de 160 s et une décompression rapide, inférieure à 30 s en fin de cycle. Le système se trouvait à température ambiante (25°C).

Une fois traités, les échantillons ont été lavés par centrifugation (3600 g/ 15 min/ 20°C) et repris dans du milieu jambon sans MES dans des fioles bafflées puis incubés à 30°C sous agitation orbitale (200 rpm). Des prélèvements sont effectués avant le traitement en pression, juste après le traitement puis toutes les 2h pendant 48h. Les milieux utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans le **Tableau 1**.

Pour nos essais, deux conditions ont été testées en triplicats :

- Traitements réalisés sur des co-cultures en milieu jambon (témoins : cultures simples de *L. lactis* et *B. subtilis* traitées de la même façon que les co-cultures)
- Traitements réalisés en ajoutant 50 UI/mL de nisine dans le milieu jambon pendant et après le traitement HP. Cela permet de mimer la production de nisine par *L. lactis* avant le traitement (témoins : cultures simples de *L. lactis* et *B. subtilis* avec ajout de 50 UI/mL de nisine dans le milieu et traitées de la même façon que les co-cultures)

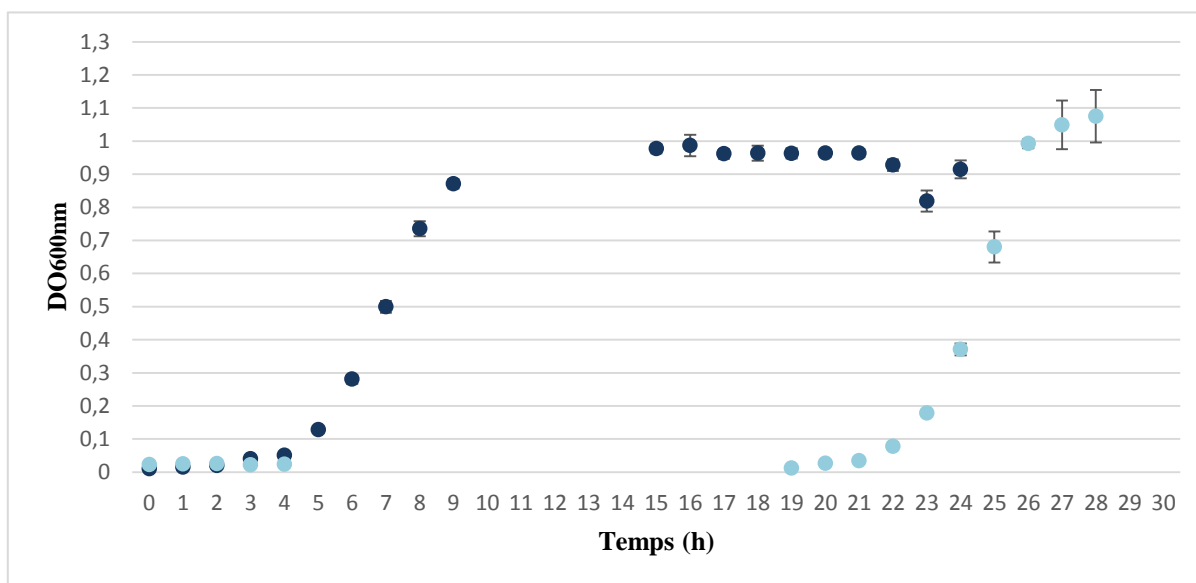
Par soucis de temps et de matériel, les témoins des co-cultures sans traitement HP n'ont pas pu être réalisés et ne seront donc pas présentés dans les résultats.

### III. Résultats et discussion

#### 1. Effet antagoniste de *L. lactis* BS30

##### 1.1. L'application d'un traitement HP affecte la croissance bactérienne

La croissance de *L. lactis* a été suivie après traitement HP par lecture de la  $DO_{600}$  en fonction du temps comme présenté sur la **Figure 4**.



**Figure 4.** Evolution de la  $DO_{600}$  d'une culture de *L. lactis* BS30 en fonction du temps en milieu jambon sans traitement HP (*bleu foncé*) ou après traitement HP (*bleu clair*). Les cellules ont été traitées selon la méthode décrite en section II.3. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent les écart-types standards pour un triplicat.

Lorsque *L. lactis* n'est pas traité en HP, la phase de latence est courte et d'environ 4h. Au bout de 8h, les cellules entrent en phase exponentielle avancée puis la phase stationnaire est atteinte au bout de 12h environ (**Figure 4, courbe bleu foncé**).

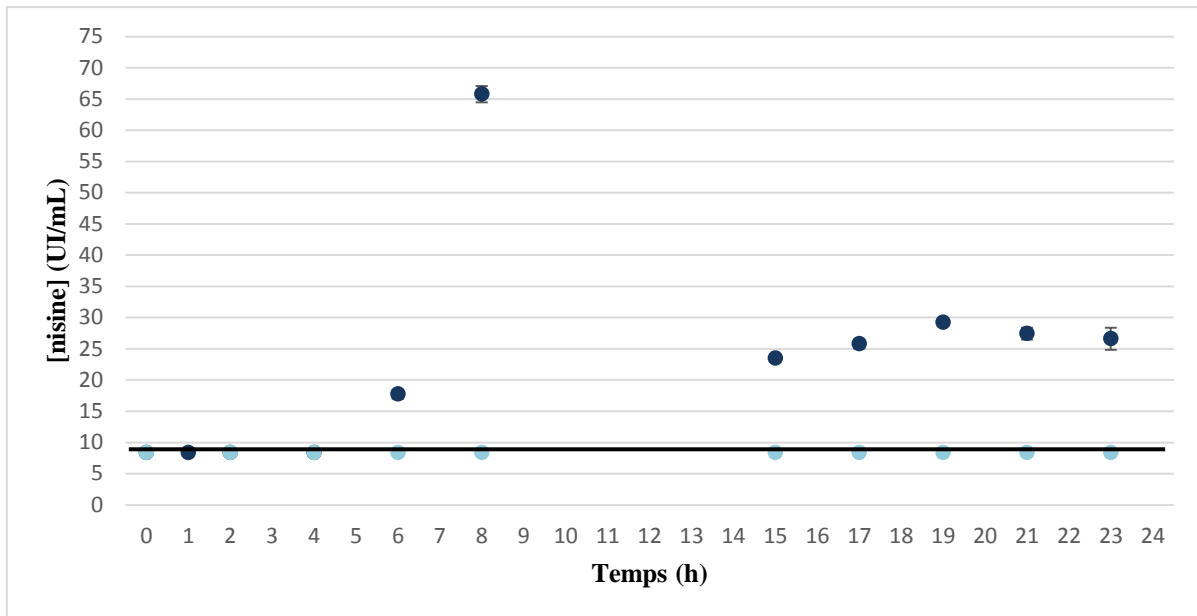
La phase de latence des cellules traitées est augmentée de manière considérable et dure environ 20h. *L. lactis* rentre en phase exponentielle 3-4h après. Après 28h de mesure, les cellules semblent passer en phase stationnaire (**Figure 4, courbe bleu clair**).

*L. lactis* possède la même dynamique de croissance sans ou après un traitement HP hormis pour la phase de latence qui est fortement allongée après un traitement. Cet allongement peut s'expliquer par le fait que certaines bactéries meurent et d'autres sont endommagées pendant le traitement HP. Ce dernier affecte les micro-organismes à Gram positif à différents niveaux, notamment membranaire (*Vogel et al., 2002*). Cependant, les bactéries peuvent être capables de récupérer leurs fonctions vitales (*Leralsle et al., 2012 ; Vogel et al., 2002*).



## 1.2. Le traitement HP affecte aussi la production de nisine de la souche lactique

La **Figure 5** ci-après présente la quantification de la nisine au cours du temps dans une culture de *L. lactis* BS30.



**Figure 5. Quantification de la nisine au cours du temps dans une culture de *L. lactis* BS30 en milieu jambon sans traitement HP (bleu foncé) ou après traitement HP (bleu clair).** La ligne noire représente le seuil de détection de la méthode. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent les écart-types standards pour un triplicat.

La quantité de nisine produite se situe en-dessous du seuil de détection durant les quatre premières heures de culture puis est détectée à partir de 6h de culture. Il existe un pic de production au bout de 8h de culture d'environ 65 UI/mL puis la production diminue et stagne entre 25 et 30 UI/mL (**Figure 5**). La quantité de nisine produite semble corrélée à la croissance des bactéries au cours du temps. Pendant la phase de latence elle n'est pas produite ou non détectée. Elle commence à être détectée uniquement lorsque les cellules entrent en phase exponentielle. Le pic de production a lieu au maximum de la phase exponentielle des cellules et enfin sa quantité diminue dans le milieu puis stagne lors de la phase stationnaire. Le pic de production de nisine obtenu au bout de 8h est un phénomène ayant déjà été observé auparavant. Il a été montré que la production de nisine suivait la croissance bactérienne, en étant maximale en fin de phase exponentielle et en s'arrêtant lors de la phase stationnaire (*De Vuyst & Vandamme., 1992*).

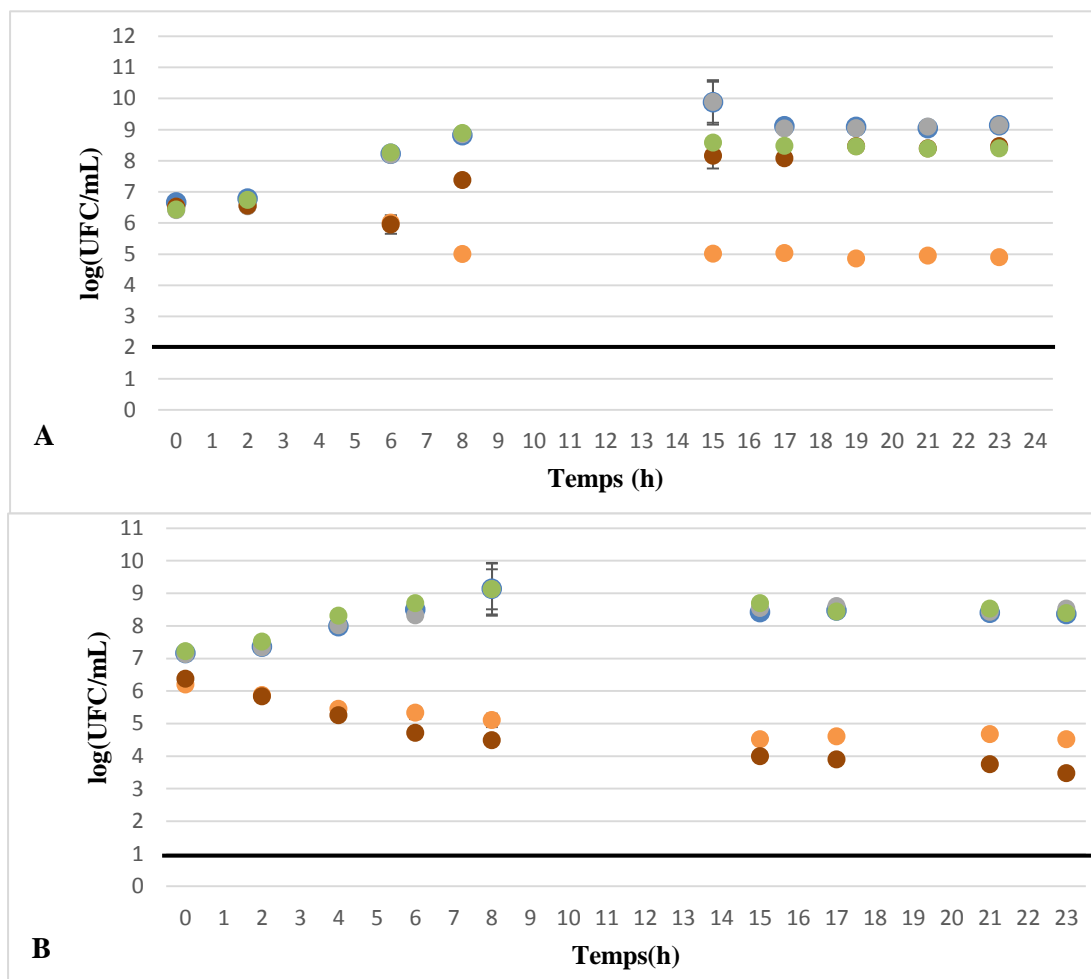
Dans le cas où les cellules ont été traitées par HP, les mesures de quantité de nisine se situaient toutes en-dessous du seuil de détection même après que *L. lactis* ait repris sa croissance. La nisine pourrait être produite en trop faible quantité pour être détectée. En considérant les temps auxquels la nisine est détectée lorsqu'aucun traitement HP n'est appliqué (à partir de 6h puis optimum au bout de 8h, **Figure 5**), la production après traitement pourrait n'avoir lieu qu'après 24h de culture, avec un optimum aux alentours de 27h.

Cependant la nisine n'a pas été quantifiée au-delà de 24h. La dernière hypothèse est qu'après traitement HP, l'expression génique va être redirigée vers la synthèse de molécules nécessaires à la régénération des cellules telles que des protéines de stress. Or, au cours d'un stress, la synthèse de ces protéines est accrue et cela entraîne une répression de la synthèse de nombreuses autres protéines (Wesche *et al.*, 2009). L'expression des gènes codant pour la production de nisine peut ainsi être réprimée suite au traitement.

## 2. Comportement des bactéries lactiques en co-culture avec une flore indésirable, à inoculum égaux

### 2.1. Sans traitement HP, *L. lactis* devient la flore majoritaire et *B. subtilis* reste sous forme sporulée

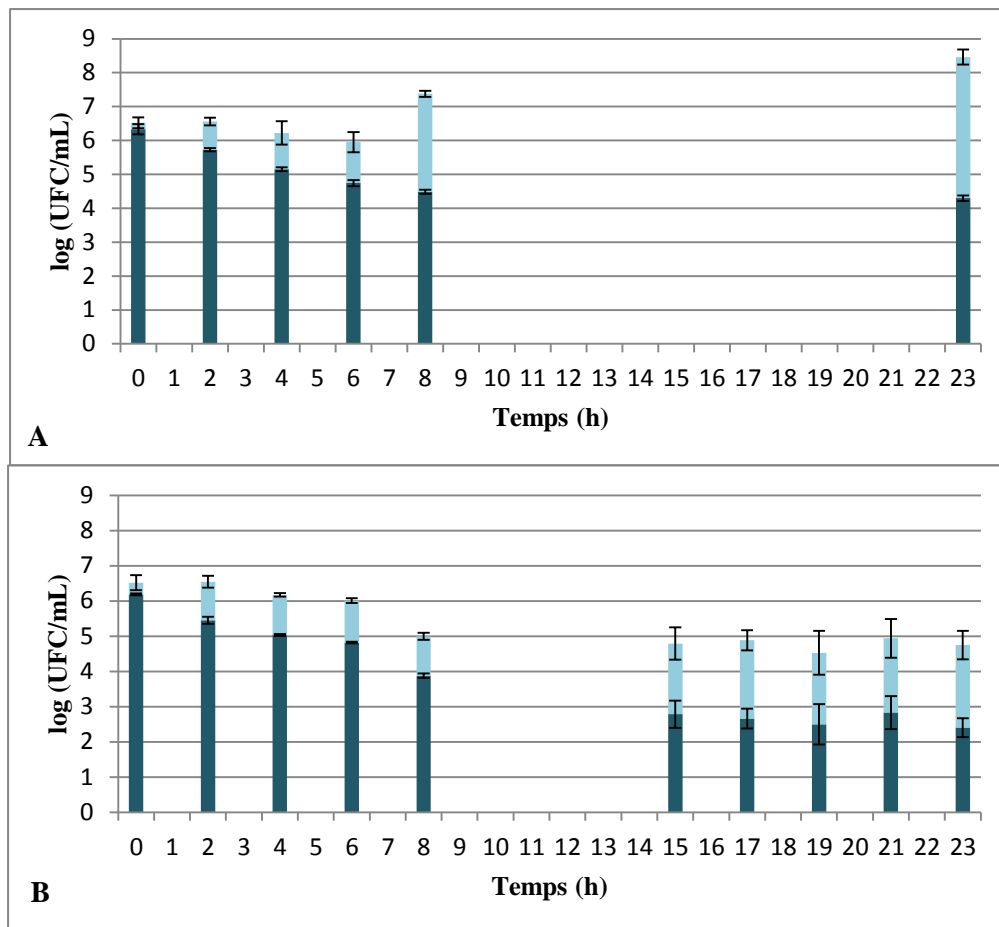
La **Figure 6** présente l'évolution des populations de *L. lactis* et *B. subtilis* en milieu jambon additionné ou non de nisine.



**Figure 6.** Evolution des populations de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 mises en co-culture en milieu jambon (A) ou en milieu jambon additionné de 50 UI/mL de nisine (B). Les deux micro-organismes ont été inoculés à hauteur de  $10^6$  UFC/mL. Flore totale (bleu), *B. subtilis* dans la co-culture (orange), *L. lactis* dans la co-culture (gris), *B. subtilis* témoin (marron), *L. lactis* témoin (vert.). La ligne noire correspond à la limite de détection de la méthode de dénombrement. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent les écart-types standards pour un triplicat.

Lorsque *L. lactis* et *B. subtilis* sont mis en co-culture, on peut voir que la souche de bactérie lactique domine. En effet, l'évolution de la population de *L. lactis* suit celle de la population de la flore totale. Une augmentation de 4 log de l'inoculum initial de *L. lactis* est observable, avec un passage d'environ 6 log à une quantité maximale de presque 10 log (**Figure 6A, courbes bleue et grise**). Dans le cas où de la nisine a été ajoutée au milieu, la croissance des bactéries lactiques reste la même et celles-ci représentent la flore totale comme dans le milieu normal (**Figure 6B, courbes grise et bleu**). A l'opposé, la population de *B. subtilis* diminue dans la co-culture. Dans le milieu normal, on observe une diminution de 1,5 log du nombre d'UFC au bout de 8h d'incubation (**Figure 6A, courbe orange**). Lorsque de la nisine est apportée en plus au milieu, la population de *B. subtilis* diminue d'environ 2 log au total (**Figure 6B, courbe orange**). Cependant, pour les deux conditions de culture, la diminution semble s'arrêter car la population stagne et la quantité de cellules se stabilise aux alentours de 4,5-5 log. Pour expliquer la stagnation de population de *B. subtilis*, l'hypothèse émise est que les cellules ayant germé auparavant sporulent à nouveau. Le micro-organisme peut aussi cesser de germer et reste sous forme sporulée pour se protéger. C'est notamment la production de nisine qui pourrait expliquer la diminution de la population de la bactérie indésirable.

L'évolution de la population de *B. subtilis* sous forme germée ou sous forme de spores est présentée dans la **Figure 7**. La population de cellules germées a été déterminée par la différence : log (cellules non traitées thermiquement) - log (cellules traitées thermiquement). Le cumul entre spores et cellules germées représente la flore totale de *B. subtilis*.



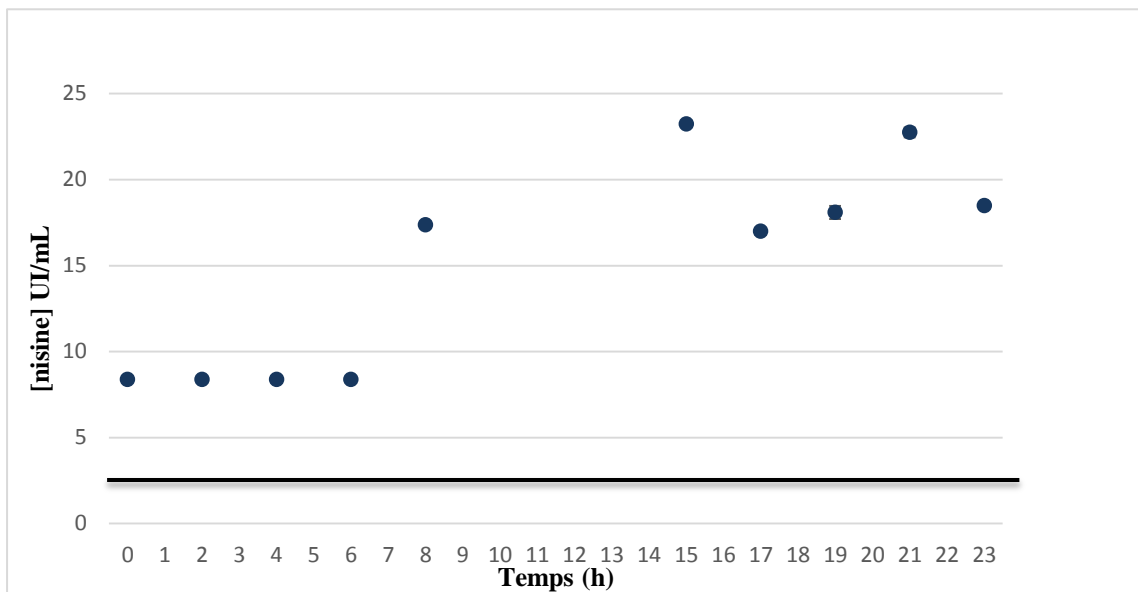
**Figure 7. Evolution des populations de spores (bleu foncé) et de cellules germées (bleu clair) de *B. subtilis* PS533 dans une culture simple (A) ou en co-culture avec *L. lactis* BS30 (B) en milieu jambon, après traitement thermique à 80°C pendant 10 min. Les résultats représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent les écart-types standards pour un triplicat.**

Le traitement thermique de 80°C pendant 10 min a permis d'éliminer les formes végétatives et les spores germées de *B. subtilis*. La population de spores restante après traitement diminue sur une douzaine d'heures environ puis stagne, en passant de 6,3 log à 2,5 log en co-culture (**Figure 7B, barres bleu foncé**). Dans la culture témoin la diminution du nombre de spores est moins importante de 2 log par rapport à la co-culture (**Figure 7A, barres bleu foncé**). Une partie des cellules va germer (**Figure 7 A et B, barres bleu clair**), cependant à partir de 15h de culture il semble s'installer un équilibre entre les quantités de cellules qui germent et de spores, que ce soit en co-culture ou dans la culture témoin (**Figure 7 A et B**). Une partie de la population reste sous forme de spores ou bien des cellules végétatives redeviennent sporulées. La présence de nisine ne semble pas être liée au fait que *B. subtilis* reste sous forme sporulée, sinon la population germerait en totalité

dans la culture témoin. Le manque d'éléments nutritifs et/ou pro-germinants dans le milieu au bout d'environ 15h de culture pourrait expliquer le fait qu'une partie de la population reste sous forme de spores. En effet, le passage de la forme végétative à la forme sporulée se produit entre autres lorsque les cellules se trouvent dans un milieu pauvre en nutriments (*Sarker et al., 2013*). Concernant la flore totale, celle-ci est environ inférieure de 4 log en co-culture par rapport à celle de la culture témoin en fin de suivi. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une partie des formes germées présentes dans la co-culture est éliminée par *L. lactis*, notamment grâce à la nisine produite.

## 2.2. La quantité de nisine produite diffère de celle détectée en culture simple

En co\_culture, la quantité de nisine détectée est moins élevée que lorsque *L. lactis* est cultivé seul. Les résultats sont présentés sur la **Figure 8**.



**Figure 8. Quantification de la nisine présente dans une co-culture de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 en milieu jambon, sans traitement HP.** La ligne noire représente le seuil de détection de la méthode. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent les écart-types standards pour un triplicat.

Dans le cas d'une co-culture, la quantité de nisine détectée est plus faible. En effet, au bout de 8h de croissance de la flore lactique (optimum de la phase exponentielle) seulement 17 UI/mL de nisine sont détectés, contre 60 UI/mL lorsque *L. lactis* est seul (**Figure 5 section III.1.1.2.**).

On peut supposer que dans la co-culture, la nisine élimine la flore indésirable. En se liant aux cellules cibles, celle-ci serait moins présente sous forme libre dans le milieu et donc moins détectable dans le surnageant. La première hypothèse possible est que la nisine adhère à la spore sans nécessairement exercer d'activité sporocide ou sporostatique. En ce sens, certains auteurs ont étudié une molécule ayant des caractéristiques proches de celles de la nisine, l'oritavancine. Il s'agit d'un peptide dont l'activité a été testée sur de spores de *Clostridium difficile*. Selon les auteurs, la molécule adhérerait à la surface des spores (*Chilton et al., 2013*). La seconde hypothèse envisageable est que la nisine inhibe la croissance des spores germées.

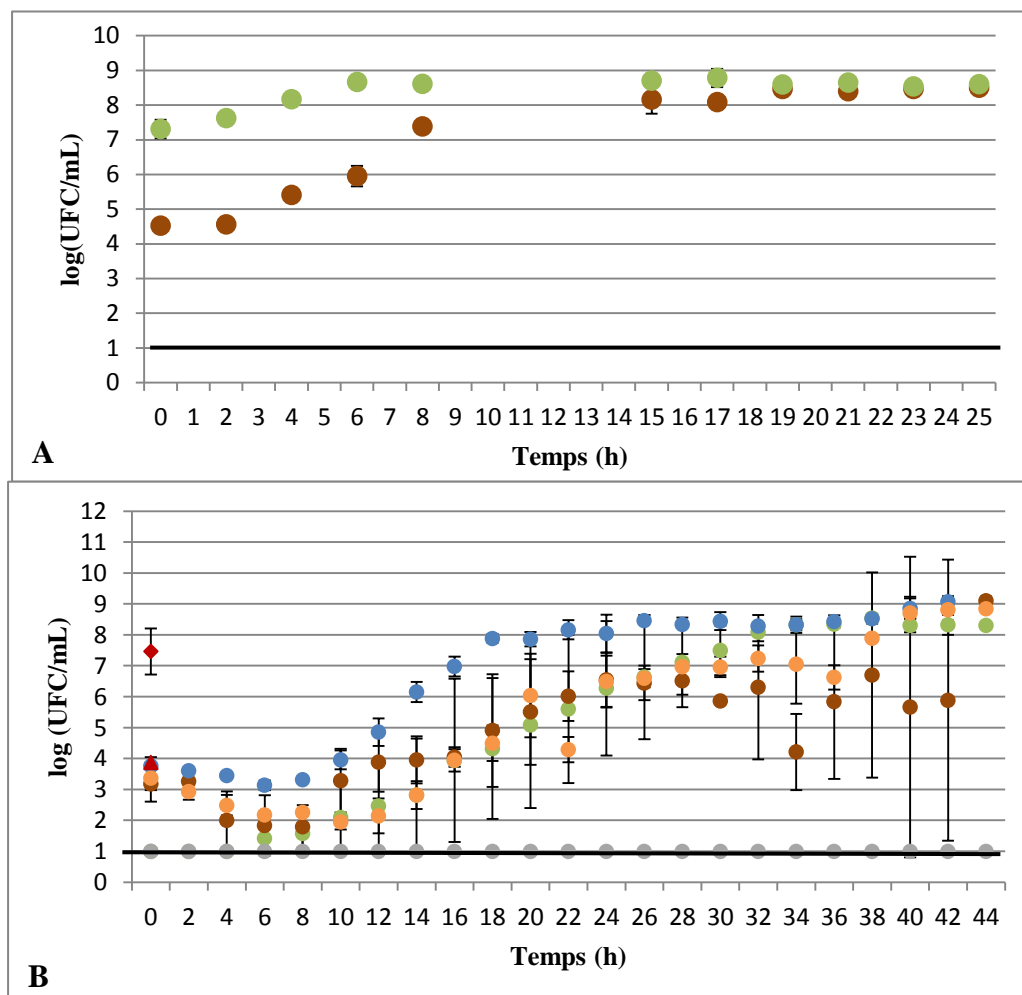
Il a été démontré qu'il était nécessaire que les spores aient initié leur germination afin que la nisine soit active (Gut et al., 2008). D'après les résultats présentés dans la **Figure 7**, une partie de la population de spores de *B. subtilis* germait et reprenait une forme végétative, forme contre laquelle la nisine peut agir.

Puisque cette dernière intervient en interagissant avec la membrane cellulaire en formant des pores, elle sera mobilisée à la surface du micro-organisme et ne sera donc plus détectée dans le surnageant.

### 3. Comportement des bactéries lactiques en co-culture avec une flore indésirable, à inoculum différents, après traitement HP

#### 3.1. En milieu jambon simple, la croissance de la flore sporulée n'est pas affectée

Les suivis de croissance obtenus pour les co-cultures *L. lactis*/*B. subtilis* après traitement HP sont présentés dans la **Figure 9**.



**Figure 9. Evolution des populations de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 mises en cultures simples sans traitement HP (A) ou en co-culture après traitement HP (B) en milieu jambon. *L. lactis* BS30 a été inoculé à hauteur de  $10^7$  UFC/mL et *B. subtilis* PS533 à  $10^4$  spores/mL. *L. lactis* (vert) et *B. subtilis* (marron), flore totale (bleu), *B. subtilis* dans la co-culture (orange), *L. lactis* dans la co-culture (gris), *L. lactis* avant traitement (losange rouge) et *B. subtilis* avant traitement (triangle rouge). La ligne noire représente la limite de détection de la méthode de dénombrement. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent les écart-types standards pour un triplicat.**

Après un traitement HP en milieu jambon (**Figure 9B**), la population de *L. lactis* diminue de 6 log que ce soit en culture simple (**Figure 9B courbe verte**) ou dans la co-culture (**Figure 9B courbe grise**).

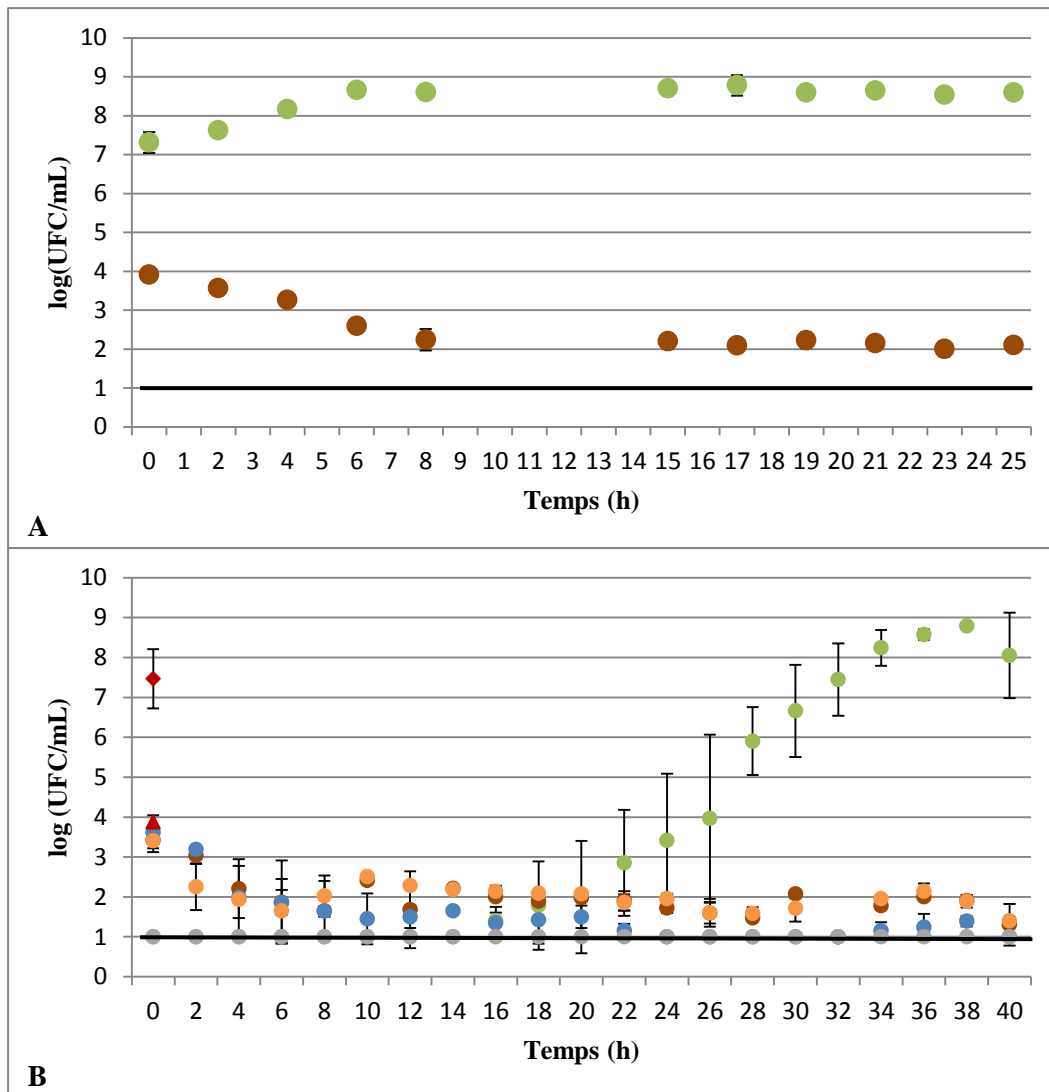
La flore lactique est d'ailleurs incapable de reprendre sa croissance lorsqu'elle se trouve en présence de la flore indésirable (**Figure 9B courbe grise**). Cette dernière est résistante au traitement HP, car il n'y a pas de diminution significative de la population juste après le traitement si l'on compare avec la population avant traitement (**Figure 9B courbe orange vs triangle rouge**). Il en est de même pour la culture simple de *B. subtilis* qui suit la même dynamique de croissance que *B. subtilis* en co-culture (**Figure 9B courbe marron**). Les formes sporulées ne sont donc pas affectées par ce type de traitement. Certains auteurs ont démontré que les spores pouvaient être résistantes à des pressions allant jusqu'à 1200MPa (*Zhang & Mittal., 2008*). D'autres ont par ailleurs réalisés des traitements HP au barème 500 MPa/5 min/20°C sur des spores de *B. subtilis*. Un tel traitement n'a pas permis d'induire la germination ou d'inactiver les spores, comme dans notre étude (*Black et al., 2008*).

Le fait que les spores ne soient pas éliminées après un traitement HP pourrait expliquer que les bactéries lactiques soient incapables de reprendre leur croissance. Il peut se mettre en place un phénomène de compétition nutritive entre les deux flores. L'inactivation des bactéries lactiques représente un avantage pour les spores se trouvant ainsi dans un environnement favorable leur permettant de germer. Les formes végétatives vont alors utiliser les nutriments présents pour leur croissance, les rendant indisponibles pour la flore lactique.

Cette hypothèse peut être supportée par le fait que dans la culture témoin de *L. lactis*, les bactéries sont capables de reprendre une croissance normale (**Figure 9B courbe verte**). L'effet de compétition a déjà été décrit dans de nombreuses études soulignant la capacité d'une bactérie non productrice d'antimicrobiens à dominer une autre bactérie. En l'occurrence, des études menées sur *L. monocytogenes* ont montré que lorsque celle-ci est présente en nombre supérieur dans une co-culture avec une bactérie lactique (*Lactobacillus plantarum*), sa croissance est optimale tandis que celle de la bactérie lactique est freinée. Il s'agit d'une répression de croissance, nommé effet Jameson. Dans notre cas, les formes sporulées se trouvent en nombre supérieur après le traitement HP vis-à-vis de la flore lactique, l'effet Jameson peut donc s'y appliquer. Ce phénomène reposerait principalement sur l'utilisation de nutriments essentiels à la flore minoritaire par la flore dominante d'une co-culture. Cela exerce un effet limitant sur la flore minoritaire qui n'est plus capable de se développer en conséquence (*Mellefont et al., 2008*).

### 3.2. En milieu jambon additionné de nisine, la croissance de la flore sporulée est inhibée

Les suivis de croissance obtenus pour les co-cultures *L. lactis*/*B. subtilis* en milieu jambon additionné de nisine et après traitement HP sont présentés dans la **Figure 10**



**Figure 10.** Evolution des populations de *L. lactis* BS30 et *B. subtilis* PS533 mis en cultures simples sans traitement HP (A) ou en co-culture après traitement HP (B) en milieu jambon additionné de 50 UI/mL de nisine. *L. lactis* BS30 a été inoculé à hauteur de  $10^7$  cellules/mL et *B. subtilis* PS533 à  $10^4$  spores/mL. *B. subtilis* témoin (marron), *L. lactis* témoin (vert), flore totale (bleu), *B. subtilis* dans la co-culture (orange), *L. lactis* dans la co-culture (gris), *L. lactis* avant traitement (losange rouge) et *B. subtilis* avant traitement (triangle rouge). La ligne noire représente la limite de détection de la méthode de dénombrement. Les points représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent les écart-types standards pour un triplicat.

Dans le cas où la nisine a été ajoutée au milieu, la dynamique de croissance de la flore indésirable est différente. Juste après le traitement, le nombre d'UFC est toujours le même qu'avant traitement (**Figure 10B, courbe orange vs triangle rouge**). Cependant, la population diminue de 2 log puis stagne tout au long du suivi (**Figure 10B courbe orange**). La même réduction de 2 log est observable pour la culture de *B. subtilis* n'ayant pas été traitée en HP (**Figure 10A courbe marron**).

La nisine aurait donc un impact majeur sur la reprise de croissance de *B. subtilis*. Il a été démontré que la nisine avait plusieurs impacts sur les spores de *Bacillus* (résultats démontrés pour *Bacillus*



*anthracis*). Comme évoqué ultérieurement, pour que cette bactériocine soit active, il est nécessaire que les spores aient initié leur germination. Des spores cultivées dans un milieu riche considéré comme pro-germinant et mises en contact avec la nisine ne sont pas capables de se développer dans un milieu neuf (*Gut et al., 2008*). En l'occurrence, lors de nos expériences, les spores étaient mises en contact avec la nisine dans le milieu jambon avant, pendant et après le traitement. *Gut et al. (2008)* ont aussi démontré qu'à partir d'une certaine concentration, la nisine empêchait les spores de reprendre leur forme végétative. Ceci pourrait nous permettre de confirmer nos résultats : la population stagnante au cours du temps, *B. subtilis* n'est plus capable de se développer et de germer sous l'action de la nisine. La bactérie reste sous forme sporulée. Paradoxalement, comme dans les conditions précédentes (**Figure 9B**), *L. lactis* n'est pas capable de reprendre sa croissance dans la co-culture (**Figure 10B courbe bleu**) mais y parvient dans la culture témoin (**Figure 10B courbe verte**). La théorie d'une compétition nutritive ne fonctionne donc plus dans ce cas de figure. Il serait possible que le traitement HP ait induit la germination de quelques spores, entraînant ainsi un relargage de DPA dans le milieu. Cette molécule pourrait avoir une action inhibitrice sur les bactéries lactiques qui n'arrivent plus à se développer mais aucune littérature n'est disponible à ce sujet.

## Conclusion

L'objectif de l'étude était d'explorer les possibilités d'utilisation d'une flore lactique productrice de bactériocines (*L. lactis* produisant de la nisine) comme flore de biopréservation, en combinaison avec un traitement HP. L'inactivation des spores représentant une préoccupation majeure pour les industriels, la combinaison entre traitement HP et biopréservation apparaît comme une alternative intéressante par rapport à l'utilisation classique de conservateurs de synthèse. Le traitement HP est capable d'induire la germination des spores et les bactériocines élimineraient les formes germées et végétatives. Afin d'étudier la faisabilité de ce procédé, il fallait tout d'abord vérifier l'impact du traitement HP sur les capacités de croissance et de production d'antimicrobiens de la souche de bactérie lactique. Dans un second temps, elle a été mise en co-culture avec une flore indésirable sporulée de *B. subtilis*. Ces co-cultures ont ensuite été soumises à un traitement HP afin de voir si *L. lactis* était capable de se régénérer et/ou d'inhiber la flore sporulée via la production de nisine.

Le traitement HP allonge la phase de latence (environ 20h) mais *L. lactis* est capable de recouvrer une croissance normale. Cependant, la production de nisine n'est plus détectée dans le milieu.

En co-culture, la flore lactique domine la flore indésirable et produit de la nisine pour l'éliminer. La population de *B. subtilis* commence à germer puis reste sous forme sporulée au vu des conditions défavorables créées dans le milieu. Après un traitement HP, *L. lactis* n'est plus capable de croître dans la co-culture tandis que les spores ne sont pas affectées et résistent. Seul l'ajout de nisine dans le milieu, combiné ou non à un traitement HP empêche le développement de la population de *B. subtilis*. Ainsi, la flore lactique utilisée est apparue peu efficace. Elle apparaît fortement sensible aux HP et n'est plus capable de produire de nisine suite au traitement.

D'autres souches de bactéries lactiques plus résistantes au traitement HP pourraient être utilisées. *L. lactis* a notamment été choisi pour sa capacité à produire de la nisine, antimicrobien déjà utilisé en tant qu'additif depuis des années. Cependant, il existe une importante diversité de peptides antimicrobiens ayant une action similaire à celle de la nisine et pouvant potentiellement être exploitables. De plus, un approfondissement concernant l'effet du traitement HP sur la production de nisine est nécessaire. Une méthode reposant sur la formation de halos d'inhibition a été utilisée afin de quantifier la nisine présente dans la culture soumise au traitement. Cette méthode n'est peut-être pas suffisamment sensible. La flore lactique pourrait être encore capable de produire de la nisine après traitement HP mais la méthode utilisée n'en permet pas la détection. Afin d'obtenir une détection plus fine, l'utilisation de la RT-qPCR est envisagée.

La souche étant par ailleurs assez sensible au barème de pressurisation utilisé au cours du stage (500 MPa), il pourrait être intéressant de tester des barèmes légèrement inférieurs, tout en considérant la contrainte créée par la résistance des spores au traitement. La mise en place d'un protocole de marquage permettant d'analyser les bactéries par cytométrie en flux a commencé à être développée au cours du stage. Connaitre l'état physiologique des bactéries après traitement HP permettrait d'optimiser les conditions d'utilisation de la flore lactique, dans l'optique de la rendre plus résistante ou améliorer la production de bactériocines par exemple.

Les études menées au cours du stage ont été réalisées dans des conditions optimales pour la croissance des bactéries utilisées. Néanmoins, dans les conditions réelles, il faut considérer la complexité du milieu dans lequel elles se trouveront mais aussi les conditions de températures de stockage du produit. Généralement, la flore lactique est majoritaire dans les produits conservés au froid. Les basses températures pourraient lui permettre de se régénérer après un traitement HP ou bien de se protéger des effets du traitement en ayant subi un pré-stress froid. Les HP semblent induire la production de certaines molécules de stress comme les Cold Shock Proteins (CSPs). De tels résultats ont déjà été prouvés sur *L. monocytogenes* (Wemekamp-Kamphuis et al., 2002), mais cela reste encore à affirmer pour les souches de bactéries lactiques utilisées dans le cadre du projet. Ces pistes sont exploitables afin de réussir à mettre en place un procédé de conservation le plus efficace possible. Celui-ci permettra à la fois de satisfaire aux contraintes rencontrées par les industriels et garantir aux consommateurs l'accès à des produits plus « naturels » ayant une durée de vie plus longue.

## BIBLIOGRAPHIE

- ANDRÉ, S., ZUBER, F. et REMIZE, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 165, n° 2, pp. 134-143. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.019.
- BLACK, E.P., LINTON, M., MCCALL, R.D., CURRAN, W., FITZGERALD, G.F., KELLY, A.L. et PATTERSON, M.F. (2008). The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 105, n° 1, pp. 78-87. DOI 10.1111/j.1365-2672.2007.03722.x.
- BRUINS, M. E., MATSER, A. M., JANSSEN, A. E. M. et BOOM, R. M. (2007). Buffer selection for HP treatment of biomaterials and its consequences for enzyme inactivation studies. *High Pressure Research*. Vol. 27, n° 1, pp. 101-107. DOI 10.1080/08957950601082573.
- 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*. Vol. 79, n° 3, pp. 483-499. DOI 10.1016/j.meatsci.2007.10.009.
- CHILTON, C.H., FREEMAN, J., BAINES, S.D., CROWTHER, G.S., NICHOLSON, S. et WILCOX, M.H. (2013). Evaluation of the effect of oritavancin on *Clostridium difficile* spore germination, outgrowth and recovery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 68, pp. 2078-2082. DOI 10.1093/jac/dkt160.
- COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P. (2005). Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature Review Microbiology*. Vol.3, pp. 777-788. DOI 10.1038/nrmicro1240.
- DE OLIVEIRA, T.L.C., RAMOS, A.L.S., RAMOS, E.M., HILDSORF PICCOLI, R., CRISTIANINI, M. (2015). Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 45, pp. 60-85. DOI 10.1016/j.tifs.2015.05.007.
- DE VUYST, L. et VANDAMME, E.J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentation. *Journal of General Microbiology*. Vol. 138, pp. 571-578.
- DI GIOIA, D., MAZZOLA, G., NIKODINOSKA, I., ALOISIO, I., LANGERHOLC, T., ROSSI, M., RAIMONDI, S., MELERO, B. et ROVIRA, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 235, pp. 53-59. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.019.
- FROEHLICH, D. A., GULLETT, E. A. et UBORNE, W. R., (1983). Effect of nitrite and salt on the color, flavor and overall acceptability of ham. *Journal of Food Science*. Vol. 48, n° 1, pp. 152-154.
- GARRIGA, M., AYMERICH, M.T., COSTA, S., MONFORT, J.M. et HUGAS, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology*. Vol. 19, pp. 509-518. DOI 10.1006/yfmic.498.
- GUINEBRETIERE, M.H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THE, C., HEYNDRIKX, M. et DE VOS, P., (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*. Vol. 10, n° 4, pp. 851-865. DOI 10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x.
- GUT, I. M., PROUTY, A. M., BALLARD, J. D., VAN DER DONK, W. A. et BLANKE, S. R. (2008). Inhibition of *Bacillus anthracis* Spore Outgrowth by Nisin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 52, n° 12, pp. 4281-4288. DOI 10.1128/AAC.00625-08.

- GUT, I.M., BLANKE, S.R. et VAN DER DONK, W.A. (2011). Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. *ACS Chemical Biology*. Vol.6, pp. 744-752. DOI 10.1021/cb1004178.
- HAN, Y., JIANG, Y., XU, X., SUN, X., XU, B. et ZHOU, G. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial population of vacuum-packed cooked ham. *Meat Science*. Vol. 88, pp. 682-688. DOI 10.1016/j.meatsci.2011.02.029.
- KLAENHAMMER, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*. Vol. 12, n° 1-3, pp. 39–85.
- LEISTNER, L. et GORRIS, L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 6, pp. 41-46. DOI 10.1016/S0924-2244(00)88941-4.
- LERASLE, M., DURANTON, F., SIMONIN, H., MEMBRÉ, J. M., CHÉRET, R., DE LAMBALLERIE, M., GUILLOU, S. et FEDERIGHI, M. (2012). Traitements par hautes pressions hydrostatiques des denrées alimentaires: état de l'art. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2012. Vol. 163, n° 12, pp. 595–614.
- LIU, W. et HANSEN, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990. Vol. 56, n° 8, pp. 2551–2558.
- LUBELSKI, J., RINK, R., KHUSAINOV, R., MOLL, G.N. et KUIPERS, O.P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Science*. Vol. 65, pp. 455-476. DOI 10.1007/s00018-007-7171-12.
- MALINOWSKA-PAŃCZYK, E., KOŁODZIEJSKA, I. et SARYCZEW, M. (2011). Changes in bacterial cells induced by high pressure at subzero temperature. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 34, n° 2, pp. 139-147. DOI 10.1016/j.syapm.2010.09.007.
- MELLEFONT, L.A., McMEEKIN, T.A. et ROSS, T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 121, pp. 157-168. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.010.
- MOLINA-HOPNER, A., DOSTER, W., VOGEL, R. F. et GANZLE, M. G. (2004). Protective Effect of Sucrose and Sodium Chloride for *Lactococcus lactis* during Sublethal and Lethal High-Pressure Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, n° 4, pp. 2013-2020. DOI 10.1128/AEM.70.4.2013-2020.2004.
- RENDUELES, E., OMER, M.K., ALVSEIKE, O., ALONSO-CALLEJA, C., CAPITA, R. et PRIETO, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 44, n° 5, pp. 1251-1260. DOI 10.1016/j.lwt.2010.11.001.
- ROSS, R.P., MORGAN, S. et HILL, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 79, n° 1, pp. 3–16.
- SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N. et HAVRANEK, J.L. (2001). Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo*. Vol. 51, n° 1, pp. 35–48.
- SARKER, M. R., AKHTAR, S., TORRES, J.A. et PAREDES-SABJA, D. (2013). High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores. *Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 41, n° 1, pp. 18-26. DOI 10.3109/1040841X.2013.788475.
- SETLOW, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*. Vol. 15, n°4, pp. 172-180. DOI 10.1016/j.tim.2007.02.004
- SMELT, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in food science & technology*. Vol. 9, n° 4, pp. 152–158.

STILES, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol.70 pp. 331-345.

TAGG, J.R., DAJANI, A.S. et WANNAMAKER, L.W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*. Vol. 40, n° 3, pp. 722.

TRAMER, J. et FOWLER, G. G. (1964). Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1964. Vol. 15, n° 8, pp. 522–528.

TRMČIĆ, A., MONNET, C., ROGELJ, I. et BOGOVIĆ MATIJAŠIĆ, B. (2011). Expression of nisin genes in cheese-A quantitative real-time polymerase chain reaction approach. *Journal of Dairy Science*. Vol. 94, n° 1, pp. 77-85. DOI 10.3168/jds.2010-3677.

VOGEL, R. F., EHRMANN, M. A., GÄNZLE, M. G., KATO, C., KORAKLI, M., SCHEYHING, C. H., MOLINA-GUTIERREZ, A., ULMER, H. M. et WINTER, R. (2002). High pressure response of lactic acid bacteria. In : *Proceedings of 2nd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Dortmund, Germany* [en ligne]. Springer. pp. 249–255. [Consulté le 12 mai 2017]. Disponible sur :<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-662-05613-4.pdf#page=246>

WEMEKAMP-KAMPHUIS, H.H., KARATZAS, A.K., WOUTERS, J.A. et ABEE, T. (2002). Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, n°2, pp. 456-463. DOI 10.1128/AEM.68.2.456-463.2002.


WESCHE, A.M., GURTLER, J.B., MARKS, B.P. et RYSER, E.T. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborn pathogens. *Journal of Food Protection*. Vol. 72, n°5, pp. 1121-1138.

WIEDEMANN, I., BREUKINK, E., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O. P., BIERBAUM, G., DE KRUIJFF, B. et SAHL, H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276, n° 3, pp. 1772-1779. DOI 10.1074/jbc.M006770200.

WOLF, C.E. et GIBBONS, W.R. (1996). Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 80, n° 4, pp. 453-457.

WORAPRAYOTE, W., MALILA, Y., SORAPUKDEE, S., SWETWIWATHANA, A., BENJAKUL, S. et VISESSANGUAN, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*. Vol. 120, pp. 118-132. DOI 10.1016/j.meatsci.2016.04.004.

ZHANG, H. et MITTAL, G.S. (2008). Effects of High-Pressure Processing (HPP) on Bacterial Spores: An Overview. *Food Reviews International*. Vol. 24, n° 3, pp. 330-351. DOI 10.1080/87559120802089290.

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Agronomie Spécialisation / option : Microbiologie Fondamentale et Appliquée Enseignant référent : Sophie JAN
Auteur(s) : Pauline SABROU  Date de naissance* : 30/11/1992	Organisme d'accueil : UMR PAM Adresse : 1 Esplanade Erasme, Bâtiment Epicure Aile Nord
Nb pages : 30                      Annexe(s) : 0	Agrosup Dijon
Année de soutenance : 2017	21000 DIJON  Maître de stage : Hélène SIMONIN
Titre français : Effet du traitement haute-pression sur une souche de bactérie lactique utilisée comme ferment de biopréservation de produits carnés type jambon.  Titre anglais : Effect of high-pressure treatment on a lactic acid bacteria strain used as a biopreservative flora of ham type meat products	
<p><b>Résumé:</b> L'ajout de nitrites dans les produits carnés permet notamment de limiter la croissance des flores sporulées représentant un risque microbiologique majeur dans le secteur agro-alimentaire. Cependant, des composés cancérogènes peuvent se former à partir des nitrites. Le projet BLacHP vise à développer de nouvelles méthodes de conservation plus naturelles afin d'assurer la sécurité microbiologique et préserver les qualités organoleptiques des aliments. La biopréservation, correspondant à l'ensemencement d'une flore bactérienne protectrice à la surface des aliments s'impose comme un procédé à fort potentiel. Un traitement haute-pression (HP) utilisé en parallèle permettrait d'éliminer la flore contaminante à des barèmes de températures plus doux que ceux appliqués habituellement. Le pouvoir antagoniste de la souche <i>Lactococcus lactis</i> BS30 productrice de nisine, cultivée seule ou en présence de spores de <i>Bacillus subtilis</i> PS533, a été évalué suite à l'application d'un traitement HP (500 MPa / 5min/ 20°C). L'effet d'une supplémentation en nisine dans le milieu a aussi été testé. <i>L. lactis</i> se développe à nouveau après traitement mais la phase de latence est allongée. Malgré cela, la production d'antimicrobien est stoppée. En co-culture, la flore lactique domine et produit de la nisine. Néanmoins, ces propriétés sont supprimées par les HP. Enfin, bien que <i>B. subtilis</i> résiste au traitement, l'ajout de nisine dans le milieu inhibe sa croissance. Afin d'optimiser le procédé, des essais avec d'autres souches de biopréservation sont envisagés.</p>	
<p><b>Abstract:</b> Addition of nitrites in meat products enables the control of spore contaminations which represent a major microbiological risk for the consumers. However, carcinogenic compounds such as nitrosamins can be formed from nitrites. BLacHP project goal is to develop new preservation methods that are more natural in order to insure microbiologic safety and keep food organoleptic properties. Biopreservation, corresponding to the inoculation of a protective bacterial flora in foods appears to be a process of great interest. In combination, the use of high-pressure treatment (HP) could allow eliminating the contaminant flora by applying temperatures less aggressive than usual. The antagonism of a nisin producing strain <i>Lactococcus lactis</i> BS30 against spores of <i>Bacillus subtilis</i> PS533 was evaluated after a HP treatment was applied (500 MPa / 5 min). The effect of a nisin supplementation in the medium was also tested. <i>L. lactis</i> regrowth after HP treatment was observed even if the lag phase was considerably extended (20h vs 4h without HP). However nisin production is stopped. In co-culture, <i>Lactococcus lactis</i> BS30 was dominant and produces nisin. Nevertheless, these properties are repressed by HP. Finally, even if <i>B. subtilis</i> resists to the treatment, addition of nisin in the medium inhibits its growth. To optimize the process, trials including other biopreservation strains are considered.</p>	
Mots-clés : Biopréservation, haute-pression, spores, bactérie lactique  Key Words: Biopreservation, high-pressure, spores, lactic acid bacteria	