

# RÉSUMÉ

## *ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE CERTAINS METABOLITES PRODUITS PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES AVEC IMPORTANCE BIONANOTECHNOLOGIQUE*

Élaborée par **Iulia – Roxana Ștefan**, sous la coordination scientifique de **Prof. Univ. Dr. Călina Petruța Cornea**

Mots clés: *Bactéries lactiques, bactériocines, nisine, helveticine, exopolysaccharides, couche S, probiotiques, aliments fonctionnels*

La thèse de doctorat intitulée “*Isolement et caractérisation de certains métabolites produits par des bactéries lactiques avec importance bionanotechnologique*” est élaborée par le doctorant Iulia – Roxana Ștefan sous la coordination du professeur Univ. Dr. Călina Petruța Cornea au sein de l'École doctorale d'ingénierie et de gestion des ressources végétales et animales de l'Université des Sciences Agronomiques et Médecine Vétérinaire de Bucarest, entre 2015 – 2019.

Les bactéries lactiques ont une grande importance industrielle, en particulier dans l'industrie alimentaire, en raison de leurs effets positifs sur les aliments et sur l'organisme humain. Les cultures bactériennes vivantes présentes sur différents aliments fermentés contribuent à améliorer les valeurs nutritionnelles et à renforcer l'immunité et la santé de l'intestin du consommateur. En outre, les bactéries lactiques ont la capacité de conserver les aliments, mais fournissent caractéristiques aromatiques uniques de certains produits fermentés tels que le fromage et le yaourt. En outre, les bactéries lactiques ont de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine et animale, tels que l'immunomodulation, l'intégrité intestinale et la résistance aux agents pathogènes. C'est pourquoi elles sont étudiées de manière approfondie par les chercheurs d'un point de vue génétique, physiologique et métabolique. L'activité enzymatique de ces bactéries au cours de la fermentation contribue aux propriétés organoleptiques, rhéologiques et nutritionnelles du produit fermenté. Les bactéries lactiques synthétisent de nombreux métabolites importants, notamment les protéines antimicrobiennes (bactériocines), les protéines de la surface des cellules (protéines de la couche S) et les exopolysaccharides (EPS).

Le but de cette thèse était d'isoler et de caractériser certains métabolites importants sur le plan bio(nano) technologique produits par les bactéries lactiques présentes dans les aliments frais ou fermentés. Les objectifs clés énoncés pour atteindre cet objectif sont les suivants::

- Sélection de souches bactériennes produisant des métabolites d'intérêt;
- Caractérisation des bactériocines produites par deux souches bactériennes appartenant à des espèces différentes et leur effet sur des souches sensibles;
- Isolement et caractérisation du EPS produit par deux souches bactériennes et son impact sur la texture du produit fermenté;
- Etudes sur les protéines de surface synthétisées par deux bactéries lactiques.

La présente thèse est structurée en deux parties principales: la documentation et la recherche personnelle avec un total de six chapitres auxquels ont été ajoutés *Introduction, Résumé, Conclusions* et *Bibliographie*..

**La première partie** de ce travail contient trois sections et vise à présenter l'importance des bactéries lactiques et de leurs métabolites synthétisés dans l'industrie alimentaire et pour le corps humain consommant des aliments fonctionnels.

Le **premier chapitre** décrit l'état actuel des recherches sur les métabolites synthétisés par les bactéries lactiques sélectionnées pour ce travail: bactériocines, exopolysaccharides (EPS) et couche S.

**Le chapitre II** met en évidence les nombreuses applications des bactéries lactiques et présente les principales familles et genres de bactéries utilisés dans l'industrie alimentaire ainsi que dans d'autres domaines. Ce chapitre décrit également les effets probiotiques des bactéries lactiques et les conditions auxquelles elles doivent satisfaire pour pouvoir être utilisées dans des produits probiotiques.

**Le chapitre III** est destiné à décrire les principaux métabolites synthétisés par les bactéries lactiques, en mettant l'accent sur les composés antibactériens (en particulier les bactériocines), les exopolysaccharides, les protéines de surface, les nutraceutiques, les vitamines et les enzymes.

La **deuxième partie** de ce travail, la recherche initiale, commence par le chapitre IV, dans lequel l'objet du travail et les objectifs sont présentés en détail.

**Le chapitre V** comprend la méthodologie utilisée pour les études dans le cadre de cette thèse. Ce chapitre est structuré en cinq sous-chapitres. Le premier sous-chapitre décrit les milieux de culture utilisés et les souches de bactéries produisant des métabolites d'intérêt, choisis parmi le Laboratoire de Microbiologie de l'Institut de Biologie de Bucarest, ainsi que de nouveaux isolats de différentes sources. Chaque sous-chapitre résume ensuite les méthodes utilisées pour caractériser les métabolites.

Les bactériocines ont été caractérisées en fonction du spectre d'activité et de l'influence du milieu de culture sur leur synthèse par de bactéries productrices. Après isolement et purification, des études de stabilité ont été effectuées à différentes températures, valeurs de pH, enzymes, et la détection de gènes codants pour la synthèse de bactériocine a été suivie. De plus, dans le cas de la bactériocine synthétisée par *L. lactis* 19.3, son mode d'action a été étudié sur deux souches indicatrices.

L'étude des exopolysaccharides produits par certaines bactéries lactiques incluait l'isolement et la purification, l'étude de leur synthèse dans diverses conditions de stress, l'analyse des monomères constitutifs par CCM et HPLC, l'effet du milieu de culture sur la production de EPS et l'effet des souches productrices de EPS sur les propriétés rhéologiques de produits laitiers fermentés.

Enfin, la recherche sur la couche S comprenait l'étude de sa synthèse par les souches bactériennes sélectionnées cultivées dans différentes conditions environnementales et son rôle dans la protection des cellules productrices. La recherche s'est poursuivie avec la détection du gène responsable de la synthèse des protéines de surface par PCR et l'étude de la synthèse des protéines de surface pendant la croissance bactérienne.

**Le chapitre VI** résume les résultats obtenus dans cette thèse de doctorat et leurs rapports à d'autres recherches dans le domaine. Les deux bactéries avec activité antibactérienne, *L. lactis* 19.3 et *Lb. helveticus* 34.9 synthétise des bactériocines de deux classes différentes. *L. lactis* synthétise la nisine, une bactériocine de classe I, des lantibiotiques, caractérisée par un faible poids moléculaire, résistance au pH et température élevée. La nisine produite par *L. lactis* 19.3 a un large spectre d'action, ayant une activité antibactérienne sur les autres bactéries lactiques et les bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes. Il agit sur la paroi cellulaire des cellules sensibles, menant finalement à leur mort. De plus, la synthèse de la bactériocine a également lieu dans diverses conditions de stress, y compris dans des milieux acides ou en présence de sels biliaires, ce qui peut recommander la souche productrice pour un produit probiotique. Par contre, *Lb. helveticus* 34.9 synthétise l'hélvéticine, une bactériocine de classe III, caractérisée par un poids moléculaire élevé, thermolabile, stable à la variation du pH et inactivée par la protéinase K. Cette bactériocine était caractérisée par une activité antibactérienne contre la souche *Halobacillus humanensis* 5Hum, responsable de la détérioration des peintures murales du monastère de Humor.

Les EPS synthétisés par les deux souches bactériennes sélectionnées sont de grande taille, sont constitués de glucose et sont synthétisés dans des conditions optimales et de stress, en fonction de la souche. La viscosité du lait de vache et de soja fermenté avec les deux souches productrices de EPS était variable, et sa valeur ne peut pas être corrélée dans tous les cas avec la quantité de polymère, pouvant également être influencée par les propriétés spécifiques du EPS.

Les deux souches productrices de couche S sélectionnées pour ce travail sont capables de produire ces protéines dans des conditions optimales et de stress. Synthèse maximale de la couche S par *Lb. helveticus* 34.9 était à 37° C (température optimale), suivi d'une culture à 42° C, puis des autres conditions de culture. Par contre, dans le cas de la souche *Lb. brevis* FV 403, la synthèse de la couche S est plus intense dans des conditions de stress (culture à 20° C, suivie de l'ajout de chlorure de sodium dans le milieu de croissance ou à un pH initial faible) que dans des conditions de culture optimales. Les protéines de la couche S ont un rôle protecteur sur la cellule bactérienne productrice et l'élimination de ce revêtement par traitement au LiCl 5M augmente la sensibilité et la mortalité cellulaires, en particulier dans les milieux à pH acide ou en présence de sels biliaries. L'amplification avec les amorces du gène codant pour la couche S (*slpA*) a permis d'obtenir des produits de réaction spécifiques du gène de poids moléculaire approprié pour les deux souches testées.

Il a été observé que les protéines de la couche S sont présentes tout au long de la croissance de *Lb. helveticus* 34.9, dans des conditions optimales, des bandes de protéines plus intenses ont été observées pendant la phase de croissance exponentielle, suggérant le rôle protecteur de la couche S au cours de la division cellulaire.

Enfin, les conclusions mettent en évidence les principales caractéristiques des métabolites synthétisés par les souches bactériennes sélectionnées pour ce travail. Les données présentées peuvent contribuer au développement de nouveaux produits alimentaires ou industriels aux propriétés améliorées.