

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen

Faculté Des Science de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et de l'Univers

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire au Biomédical et à l'Environnement.

Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de

Master de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Microbiologie

Présenté par

BENADI Ridha

Thème

**Étude de l'effet antagoniste d'une souche lactique S93
(*Lactococcus lactis subsp lactis*) vis-à-vis des bactéries
nuisibles**

Devant le jury :

Président : Mr ABDELOUAHED D

Professeur

Examineur : Mr REBIAHI. S

Maitre de conférences de classe B

Examinatrice : Mme BENSALAH. F

Maitre assistante de classe A

Promotrice : Mme BENDIMERAD. N

Maitre assistante de classe A

Année universitaire 2011/2012

Remerciements

Un grand merci à **Mme : BENDIMERAD N** «ma mère scientifique» pour la finesse de ses attitudes sur le plan aussi bien humain que scientifique. Merci pour ta disponibilité sans faille, ta rigueur, tes encouragements et tes remarques successives ont permis d'améliorer les différentes versions de ce travail.

Je voudrais remercier **Mr: ABDELOUAHED D** Professeur qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce travail.

Je remercie **Mme : BENSALAH F** Maitre assistante de classe A pour avoir accepté d'examiner et juger mon travail.

Je remercie **Mr : REBIAHI S** Maitre de conférences de classe B pour avoir accepté d'examiner et juger mon travail.

Mes remerciements s'adressent à tous mes camarades du laboratoire **LAMAABE** et à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire

Enfin, surtout merci à ma famille. Vous êtes ce que j'ai de plus cher et vous avez toujours été là, sans vous rien n'aurait été possible.

Dédicaces

Avant toute chose, je remercie ALLAH qui ma donné la patience, le courage et la volanté pour réaliser ce mémoire

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux personnes les plus chère au monde, à ma mère et mon père qui m'ont soutenus et m'ont offert tous les moyens pour faciliter mes études.

A mes frères et mes belles sœurs Hichem, Sofiane, Mehdi, Salih, Amel, Amira.

Mes adorables neveux Chemsou, Sarah, Younes, Yanis, Yacine.

A ma tante, mes oncles, mes cousins, mes cousines.

A mon chère ami Benmammar Riad ainsi toute la promotion de Microbiologie 2011/2012.

Table de matière

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1- Définition.....	2
I.2- Caractères généraux.....	2
I.3- Habitat	4
I.4- Classification	5
I.4.1- Genre lactococcus	6
I.4.1.1- Définition	6
I.4.1.2- Caractères généraux	6
I.4.1.3- Intérêt en industrie	6
I.5- Intérêt des bactéries lactiques sur la santé humaine	6

Chapitre II : Interactions

II.1- Définition	8
II.2- Différents types d'interactions	8
II.2.1- Interactions directes	8
II.2.1.1- Prédation et parasitisme	8
II.2.1.2- Inhibition par contact direct entre les cellules	8
II.2.2- Interactions indirectes	9
II.2.2.1- Mutualisme	9
II.2.2.2- Neutralisme	9
II.2.2.3- Commensalisme	9
II.2.2.4- Compétition	9
II.2.2.5- Quorum sensing	9
II.2.2.6- Antagonisme	10

II.3- Facteurs inhibiteurs	10
II.3.1- Acides carboxyliques	10
II.3.2- Peroxyde d'hydrogène	10
II.3.3- Phages lactiques	11
II.3.4- Diacétyl	11
II.3.5- Reutéline	11
II.3.6- Dioxyde de carbone	12
II.3.7- Bactériocines	12
II.3.7.1- Définition.....	12

Chapitre III : Bactéries pathogènes et d'altérations

III.1- Définition	13
III.2- Listeria monocytogenes	14
III.3- Escherichia coli	15
III.4- Staphylococcus aureus	16
III.5- Bacillus cereus	17
III.6- Enterococcus faecalis	18

Partie 2 : Méthodologie.....19/20

I. Préparation des souches.....	19
II. Mise en évidence de l'effet antagonisme.....	20
II.1- Méthode en profondeur.....	20
II.2- Méthode de Flemming et al (1985)	20
III. Détermination du facteur inhibiteur.....	20
VI. Effet bactéricide ou bactériostatique.....	23
V. Durée de vie d'une bactérie pathogène en interaction avec la souche S93.....	23

Partie 3 : Résultats et interprétations.....	25
I. Détection de l'effet antagonisme.....	25
II. Détermination de la nature d'inhibition.....	26
II.1- Inhibition du à l'acide.....	26
II.2- Inhibition du aux bactériocines.....	26
III. Effet bactéricide ou bactériostatique.....	27
VI. Durée de vie d'une bactérie nuisible en interaction avec la souche S93.....	28
Partie 4 : Discussion.....	30
Conclusion générale.....	32

Annexes

Liste des figures

Figure n°1 : Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose (Raynaud, 2006).....	3
Figure n°2 : Aspect de <i>listeria monocytogene</i> en microscopie électronique.....	14
Figure n°3 : Aspect d'<i>E. Coli</i> en microscopie électronique.....	15
Figure n°4 : Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique.....	16
Figure n°5 : Aspect de <i>Bacillus cereus</i> en microscopie électronique.....	17
Figure n°6 : Aspect d'<i>Enterococcus feacalis</i> en microscopie électronique.....	18
Figure n°7 : Schéma représentatif de la méthode de Fleming et al ;(1985)	22
Figure n°8 : Durée de vie d'une souche lactique et souches pathogènes ensemencées en interaction dans le lait écrémé.....	24
Figure n°9 : Zones d'inhibitions formées par la souche S93 en antagonisme avec les bactéries nuisibles.	25
Figure n°10 : Effet antagoniste de S93 vis-à-vis <i>E. Coli</i>.....	25
Figure n°11 : Inhibition par l'acide des bactéries pathogènes	26
Figure n°12 : Zone d'inhibition dans le milieu neutralisé : <i>E .coli</i>.....	26
Figure n°13 : Inhibition des bactéries pathogènes par S93 en utilisant la pepsine.	27
Figure n°14 : Effet bactéricide ou bactériostatique.	28
Figure n°15 : Cinétique de croissance de la souche S93 et <i>Bacillus</i> en interaction dans le lait écrémé	28
Figure n°16 : Cinétique de croissance de la souche S93 et <i>Listeria</i> en interaction dans le lait écrémé.....	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents genres de bactéries lactiques (Dortu et Thonart, 2009).....	5
Tableau 2 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaines (Esther, 2009).....	7
Tableau 3: Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques selon Eijsni et al (2002).....	13
Tableau 4 : Bactéries utilisés et leur origine.....	19

Introduction

Depuis des millénaires, les aliments fermentés font partie du menu des hommes, qui apprécient leurs propriétés gustatives et sanitaires et leur longue durée de conservation.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans la fermentation de différents aliments. Leurs capacités à produire des acides organiques accompagnés de l'abaissement du pH est le majeur facteur par lequel ces dernières inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, l'alcool et le diacetyl synthétisés par les bactéries lactiques peuvent aussi contribuer à la préservation des produits alimentaires. De plus, ces dernières peuvent synthétiser des composés inhibiteurs de nature protéique appelés bactériocines.

Dans ce contexte ce travail consiste à rechercher l'activité antagoniste de la souche S93 appartenant à la sous espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* vis à vis des bactéries pathogènes en suivant les étapes suivantes :

- ❖ La première partie consiste à rechercher l'effet antagoniste de la souche S93 vis-à-vis des cinq bactéries pathogènes et d'altération.
- ❖ Dans la deuxième partie, nous allons déterminer la nature du facteur inhibiteur : acide ou bactériocines.
- ❖ Puis dans la troisième partie, on va tester l'effet s'il est bactéricide ou bactériostatique.
- ❖ Enfin, nous allons étudier la durée de vie des bactéries nuisibles en interaction avec la bactérie lactique S93.

Chapitre I : Bactérie lactique

I.1- Définition :

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes (Labiouiet et *al*, 2005).elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (Generally Regarded As Safe) (Ait Belghanaouyi, 2006).

Les bactéries lactiques interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires : saumurage des légumes, boulangerie, fabrication de vin, saurissage des poisson, des viandes etc..., en contribuant à la texture, à la saveur des aliments et a la production de composés aromatiques (Callewaert et *al*, 2000).

Elles fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bioconservation des denrées alimentaires (Carmen et *al*, 2000).

I.2- Caractères généraux :

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, autonomes et procaryotes (Doleyres, 2002). Elles sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram positif avec un type respiratoire aéro-anaérobies facultatives ou micro-aérophiles, asporulées, généralement non mobiles, catalase négative, oxydase négative, elles ne présentent ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase, ne liquéfient pas la gélatine ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux, seulement quelque espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance : acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, vitamine B, des acides gras, les sels et les glucides fermentescibles (Dellaglio et *al*, 1994; Gonzalez et al 2000). C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (Larpent, 1989 ; Novel, 1993).

Les bactéries lactiques se distinguent par leurs types de métabolisme, Lorsque l'acide lactique est le principal produit de la fermentation, le métabolisme est **homofermentaire** tandis que, si sa production est associée à du dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol, le métabolisme est **hétérofermentaire**.

Les bactéries lactiques qui ont un métabolisme homofermentaires sont : *lactocoques*, *pédiocoques* et quelque *lactobacilles*.

Les bactéries lactiques dont le métabolisme est hétérofermentaire sont : *lactobacilles* et *leuconostocs*.

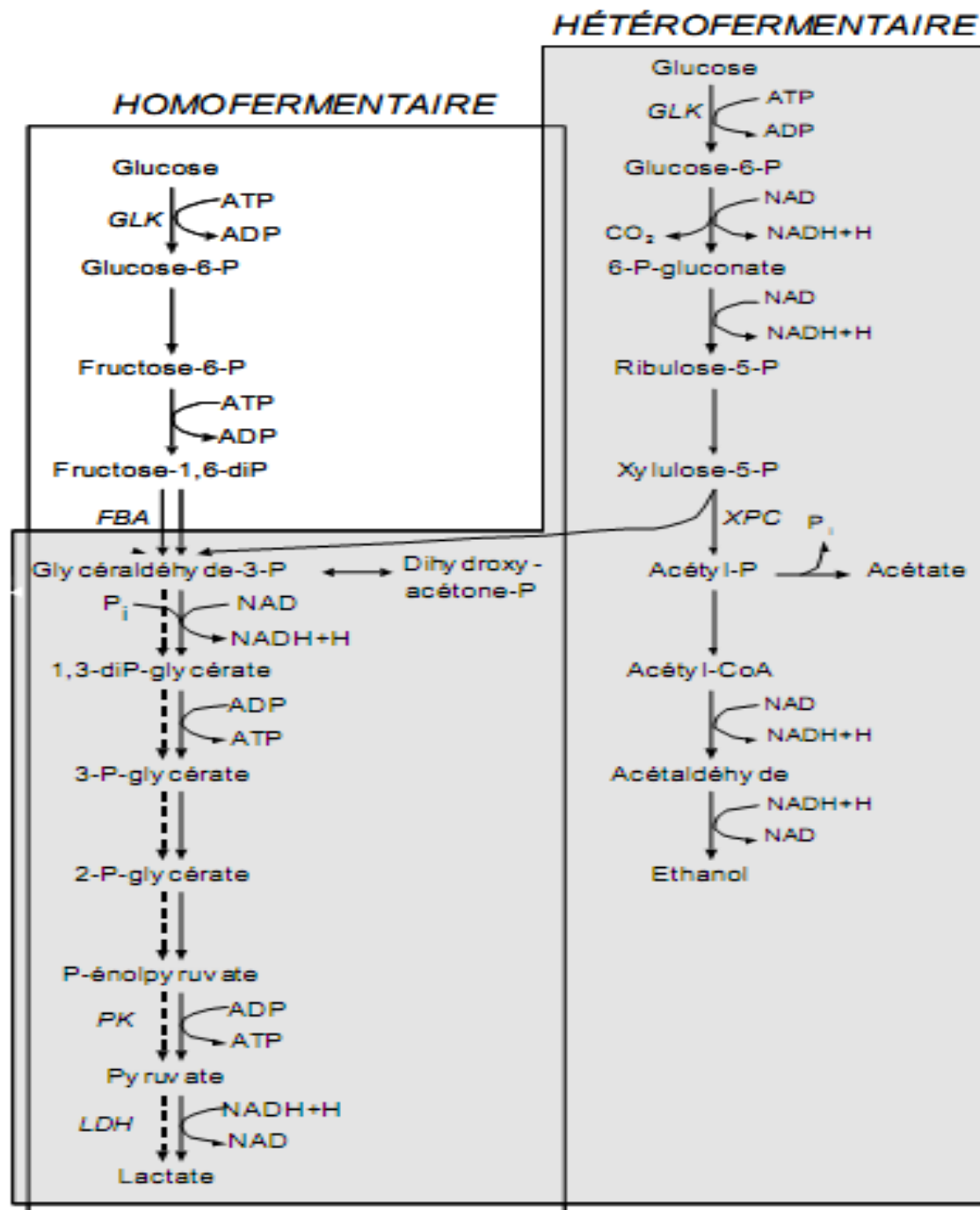


Figure n°1: Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose. Les principales enzymes sont : **GLK** : glucokinase, **FBA** : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, **XPC** : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, **PK** : pyruvate kinase, **LDH** : lactate déshydrogénase. (Raynaud, 2006)

I.3- Habitat :

Les bactéries lactiques sont des ubiquistes, on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, les viandes, les poissons, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Douault et Corthier, 2000) et ont été également retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout.

I.4- Classification :

Tableau 1 : Différents genres de bactéries lactiques (Dortu et Thonart, 2009).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	bacilles	Homofermentaires Ou Hétérofermentaire	Thermophile Ou Mésophile	GI : 23 GII : 16 GIII : 22
<i>Carnobacterium</i>	bacilles	Hétérofermentaire	Psychrotrophes	6
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophile	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Thermophile Ou Mésophile	19
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophile	13
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophile	2
<i>Pediococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophile	2
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en Tétrades	Homofermentaires	Mésophile	7
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophile	9
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophile	1
<i>Bifidobacterium</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophile	1
<i>Weissella</i>	Bacilles Coccobacilles Coques ovoïdes	Hétérofermentaire Strictes	Psychrotrophes	6
<i>Aerococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophiles	7

I.4.1- Genre lactococcus :

I.4.1.1- Définition :

Le genre *Lactococcus* a été proposé par Schleifer et al (1985) pour reclasser les souches du genre *Streptococcus* (*Streptococcus* du groupe N) et des espèces de *Lactobacillus*. Il a été défini sur la base des critères et du séquençage d'ARN 16S (Schleifer et al, 1985; Collins et al, 1989). Le genre *Lactococcus* comprend 5 espèces (www.bacterio.cict.fr) *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus plantarium* et *Lactococcus lactis* qui est subdivisé sous espèces suivantes : *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactococcus lactis ssp cremoris* et *Lactococcus lactis ssp hordniae* antérieurement classifié dans le genre *Lactobacillus*, et un biovar *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis*.

I.4.1.2- Caractères généraux :

Lactococcus sont des coques, qui forment des chaînes de longueur variable, elles ont un métabolisme homofermentaire produisant exclusivement l'acide lactique L (+) (Roissart, 1994).

Elles ont un optimum de croissance voisin de 30°C et ne poussent pas a pH 9,6 ou en présence de 6,5% de NaCl, excepté *Lactococcus garvieae*, elles ne sont pas hémolytiques.

I.4.1.3- Intérêt en industrie :

Lactococcus lactis ssp lactis que ce soit sous forme pure ou associée à d'autres micro-organismes, est la souche la plus mésophile couramment utilisé comme une culture de départ pour les produits laitiers, ainsi elles remplissent un rôle irremplaçable pour assurer la structure, le goût, la conservation et la salubrité de ces produits (Jensen et Hammer, 1993; Salminen, et Von Wright, 1993; Roissart, 1994; Boonmee et al, 2003; Ziadi et al, 2005; Do-Won et al, 2006), elles jouent également un rôle important dans l'amélioration de l'arôme (Salminen, et Von Wright, 1993; Van Niel et Hahn-Hägerdal, 1999; Boonmee et al, 2003). Pour ces raisons ce micro-organisme a un grand potentiel commercial.

I.5- Intérêt des bactéries lactiques sur la santé humaine :

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, après ingestion en quantité adéquate, produisent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Un intérêt considérable s'est développé ces dernières années autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets « probiotiques » (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées sont choisis comme vecteurs privilégiés des cultures probiotiques (www.cniel.com).

Tableau 2 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaines (Esther, 2009).

<i>Effets probiotiques</i>	<i>Mécanismes d'activités proposées</i>
Amélioration de la digestion de lactose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Action de la β-galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle.
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale ▪ Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Résistance à la colonisation par des bactéries pathogènes. ▪ Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Modulation de la flore intestinale ▪ Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Assimilation du cholestérol. ▪ Déconjugaison des sels biliaires.
Prévention du cancer du colon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stimulation du système immunitaire. ▪ Production de composés antimutagéniques. ▪ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques. ▪ Inhibition de carcinogènes ▪ Élimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

Chapitre II : Interactions :

II.1- Définition :

L'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments sont des éléments importants pour le développement des micro-organismes. Ils peuvent ainsi générer des phénomènes d'interaction de différente nature. Tout au long du processus de fabrication, on observe une dynamique au sein des populations. Certains micro-organismes se multiplient activement, alors que d'autres tendent à disparaître (Nissen et *al*, 2003).

Lorsque deux populations différentes de micro-organismes partagent le même environnement, des interactions peuvent s'établir entre elles. Ces phénomènes sont relativement fréquents en œnologie en raison de la non-stérilité des milieux de fermentation (Nissen et *al*, 2003).

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire des acides organiques accompagnés de l'abaissement du pH qui sont les majeurs facteurs par lequel ces dernières inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, l'alcool et le diacetyl synthétisés par les bactéries lactiques peuvent aussi contribuer à la préservation des produits alimentaires (www.ummo.dz).

II.2- Différents types d'interactions :

Il existe deux types d'interactions : directe et indirecte.

II.2.1- Interactions directes : impliquent un contact entre deux micro-organismes et comprennent la prédation, le parasitisme, la symbiose et l'inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism » (Nissen et *al*, 2003).

II.2.1.1- Prédation et parasitisme :

Dans ce type de relation, l'une des espèces vit totalement au dépend de l'autre. La victime devient un substrat et est totalement digérée dans le cas de la prédation ou bien une partie de ses tissus est consommée comme dans le cas du parasitisme (Nehem, 2008).

II.2.1.2- Inhibition par contact direct entre les cellules :

Dans ce type d'interaction, une population de micro-organismes est inhibée par une autre et ceci par contact direct entre les cellules des deux populations lors de leur culture mixte. L'inhibition dans ce cas ne résulte ni d'une limitation en nutriments ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais plutôt d'un contact direct avec les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée de cellules viables (Nissen et *al*, 2003).

II.2.2-Interactions indirectes : sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le neutralisme, le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme, la compétition et le « quorum sensing » (Bailey et Ollis, 1986, Nissen et al. 2003, Kleerebezem et al. 1997).

II.2.2.1- Mutualisme :

On distingue deux phénomènes : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (proto coopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement (Nehem, 2008).

II.2.2.2- Neutralisme :

La présence d'une population n'affecte pas l'autre.

II.2.2.3- Commensalisme :

Le commensalisme est une interaction où un micro-organisme bénéficie de la présence d'un autre, sans que ce dernier en tire profit (Sieuwert et al, 2008).

II.2.2.4- Compétition :

Dans le cas de la compétition, les deux populations se développent sur le même substrat et consomment toutes les deux un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance et celle dont la vitesse de croissance est la plus affectée sera la plus désavantagée (Nehem, 2008).

II.2.2.5- Quorum sensing :

Chez les bactéries Gram positives et Gram négatives, la capacité d'une population bactérienne entière d'exprimer un phénotype spécifique en réponse à de petites molécules signales solubles et dont l'expression dépend de la densité cellulaire (ex : lactones homosérines, phéromones) est définie comme étant le phénomène de « quorum sensing » (Fuqua et al. 1996, Kleerebezem et al. 1997).

II.2.2.6- Antagonisme :

L'amensalisme est une interaction inter-espèces où la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes a un effet inhibiteur sur le développement d'autres micro-organismes présents dans le même environnement, sans que le micro-organisme inhibiteur en tire le moindre profit. Certains métabolites tel que les acides carboxyliques, le lactate, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines participent à ce phénomène (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Van de Guchte *et al*, 2001 ; Sieuwerts *et al*, 2008).

Les effets inhibiteurs agissent sur la croissance des micro-organismes pathogènes, indigènes ou inoculés (Sieuwerts *et al*, 2008).

II.3- Facteurs inhibiteurs :

II.3.1- Acides carboxyliques :

Dans les produits laitiers, les bactéries lactiques sont capables de produire la majorité des métabolites cités précédemment. L'acide lactique est le métabolite majeur issu du métabolisme fermentaire utilisé par certaines bactéries lactiques. Cet acide organique baisse le pH à un niveau conduisant à l'inhibition de la croissance des bactéries appartenant au genre *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* et des bactéries des flores de surface acido-sensibles (Oh et Marshall, 1993 ; Holzappel *et al*, 1995).

L'acide acétique a un effet inhibiteur plus important sur *L. monocytogenes* (Ahamad et Marth, 1989) mais les deux acides organiques peuvent agir de manière synergique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu, ce qui augmente la toxicité de l'acide acétique (Adams et Hall, 1988). La plupart du temps, les acides organiques faibles ne diminuent pas la viabilité des micro-organismes mais retardent leur croissance en allongeant par exemple la phase de latence (Oh et Marshall, 1993 ; Holzappel *et al*, 1995).

II.3.2- Peroxyde d'hydrogène :

Les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (Van de Guchte *et al*, 2001). Cette molécule neutre diffuse librement à travers la membrane cellulaire; elle est peu réactivé vis-à-vis des composants cellulaires.

Ces deux produits sont des molécules très délétères pour la cellule réagissant sur de nombreux composants cellulaires essentiels tels que l'ADN, les protéines et les lipides ce qui entraîne la mort de la cellule. Le peroxyde d'hydrogène possède donc un effet inhibiteur sur la croissance de micro-organismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases (Touati, 2000).

II.3.3- Phages lactiques :

Les bactériophages des bactéries lactiques sont un exemple connu de parasitisme. Lors de la fermentation, les phages peuvent subitement conduire à la lyse des souches dominantes, causant ainsi une altération du produit fermenté mais aussi des importantes pertes économiques pour les industriels (Sieuwerts et al, 2008).

II.3.4- Le diacétyl :

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney et al, 1998).

II.3.5- Reutéline :

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (El-Ziney et al, 1998). La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « glycérol déshydratase » pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutéline s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (Vollenweider, 2004).

La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes Gram-positif ou Gram-négatif, les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004).

II.3.6- Le dioxyde de carbone :

Intermédiaire de fermentation de certains substrats par les bactéries lactiques hétérofermentaires, le CO₂ crée des conditions anaérobies dans le milieu, pouvant conduire à l'élimination de bactéries aérobies strictes. Ceci peut en revanche aussi favoriser dans le même temps le développement de flores anaérobies qui peuvent être parfois néfastes (Papa Abdoulaye, 2011)

II.3.7- Les bactériocines :

II.3.1.1- Définition :

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram⁺. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les souches les produisant peuvent donc également être utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et/ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible.

Tableau 3: Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques selon Eijsnik et al, (2002)

<i>Classe de bactériocines</i>	<i>Sous classe de bactériocines</i>	<i>Bactériocines</i>
Classe I : lantibiotiques contenant des lanthionines ou β -lanthionines à faible poids moléculaires	<i>Type A</i> : elongated shaped molécules (<4 kDa).	Nisine A Nisine Z Subtiline
	<i>Type B</i> : molécules globulaires (1,8 à 2,1 kDa).	Actagardine Mutacin II
Classe II : bactériocines à faible poids moléculaires (< 10 kDa) thermostables	<i>Sous classe IIa</i> : pediocin like anti-Listeria	Pédiocine PA-1 Leucocine Sakacine A
	<i>Sous classe IIb</i> : bactériocines à 2 peptides	Plantaricine JK Plantaricine EF
	<i>Sous classe IIc</i> : autres bactériocines	Lactococcine 972
Classe III : bactériocines de haut poids moléculaires (>30 kDa) non thermostables		Helvéticine J Millericine B

Chapitre III : Bactéries pathogènes et d'altération

III.1- Définition :

Les bactéries pathogènes sont susceptibles d'entraîner des maladies, des toxi-infections alimentaires ou intoxication causé par la production de toxines des bactéries (Thierry, 2008).

III.2- *Listeria monocytogenes* :

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif, asporulée, aéro-anaérobie facultative, hémolytique et catalase-positif, ayant tendance à se grouper en chaînettes ou en palissades. C'est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance est de 30 à 37°C, elle a la particularité d'être psychrotrophe, elle peut survivre, voir se multiplier, à des températures basse qui varie entre 2 et 4°C.

C'est une bactérie ubiquiste, largement distribuée dans le milieu extérieur : air, sol, eaux usées provenant des abattoirs et des égouts, végétation, ensilage, etc. L'environnement plante-sol paraît constituer un réservoir privilégié à partir duquel *Listeria monocytogenes* peut contaminer l'homme, les animaux et les aliments. Malgré l'absence de spore, *Listeria monocytogènes* fait preuve d'une surprenante résistance à différents agents physiques et chimiques. Sa destruction par pasteurisation du lait est inconstante (D 72°C = 1,6 à 2 s) ; un traitement de pasteurisation (72°C/15 secondes dans le cas du lait) est jugé suffisant pour la détruire. (El Atyqy, 2010).

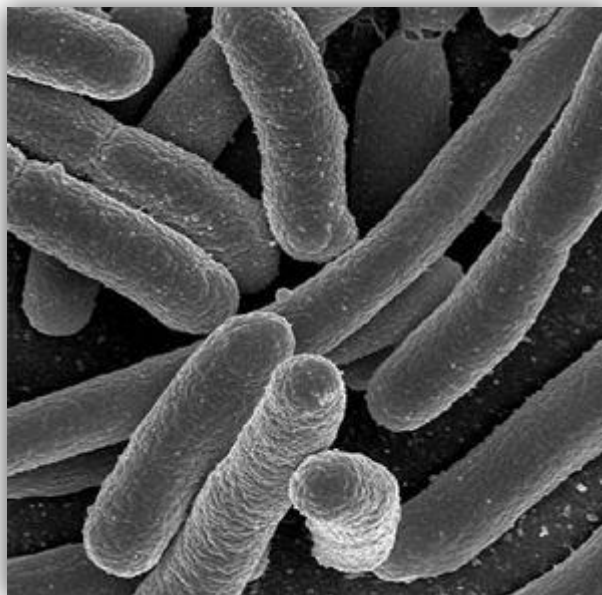


Figure n°2 : Aspect de listeria monocytogenes en microscopie électronique.
(<http://www.marlerblog.com>)

III.3- *Escherichia coli* : (Colibacille)

Elle appartient à la famille des Entérobactéries, c'est un bacille Gram- anaérobie facultative possédant des flagelles péritriches (Philipon, 2004 ; Kaiser, 2004). C'est une bactérie (eubactérie) commensale du tube digestif des animaux et de l'homme (Philipon, 2004 ; Bharat, 1996).

Colibacille est un indicateur d'une contamination fécale car sa présence dans l'eau et le sol n'est pas considérée normale (Bharat, 1996 ; Kaiser, 1998). Elles sont largement utilisées en génie génétique, Des travaux ont permis d'insérer l'ADN d'organismes étrangers dans ses plasmides et ses bactériophages. (Philipon, 2004).



*Figure n°3 : Aspect d'E. coli en microscopie électronique.
(<http://www.freedrinkingwater.com>)*

III.4- *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus représente l'espèce la plus largement incriminée dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), elle appartient au groupe des staphylocoques à coagulase positive. C'est une bactérie en forme de coque, immobile sphérique, Gram positif, associée par groupes en amas (grappe de raisin) ou en chaînes. D'environ 1 micromètre de diamètre, aéro-anaérobie facultative, thermosensible, qui requiert des températures de croissance comprises entre 6 et 46°C (avec optimum à 37°C). C'est une bactérie neutrophile (croissance entre pH 4 et 9,8) qui survit dans les aliments déshydratés et/ou congelés, sa croissance peut être inhibée par la présence de flores de compétition présentes dans les aliments. Son rôle pathogène en toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est lié à entérotoxines staphylococciques (Hennekinne, 2009).

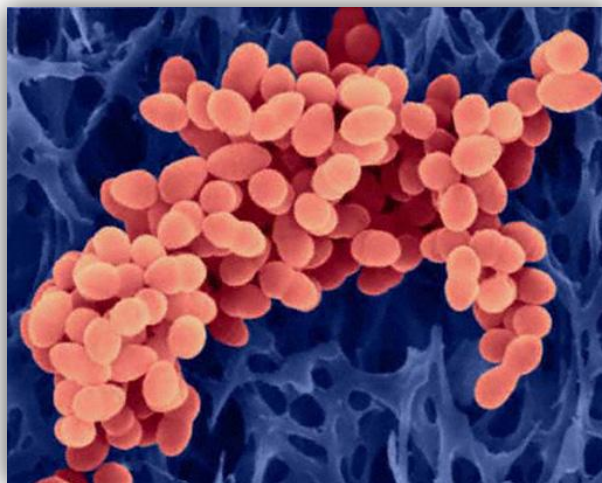


Figure n°4 : Aspect de S. aureus en microscopie électronique.
(<http://www.museevirtuel.ca>)

III.5- *Bacillus cereus* :

Bacillus cereus est un bacille à Gram positif, sporulé, aéro-anaérobie facultatif, bactérie tellurique contaminant fréquemment les végétaux, psychrotrophes, capables de proliférer à +4°C et de produire des toxines à +6°C. Le réservoir de cette bactérie est hydro-tellurique en raison de sa survie possible dans l'environnement sous forme de spore. Les principaux aliments à risque sont d'origine végétale, en particulier le riz et les épices (Bornet, 2000).

Bacillus cereus est un contaminant potentiel de nombreux plats cuisinés. La cuisson ne suffit généralement pas à détruire les spores de cette bactérie, dont la germination et la croissance peuvent s'effectuer si le produit est entreposé au froid de façon prolongée. Il possède deux types de toxines impliquées dans des accidents d'origine alimentaire (G. Bornet, 2000).

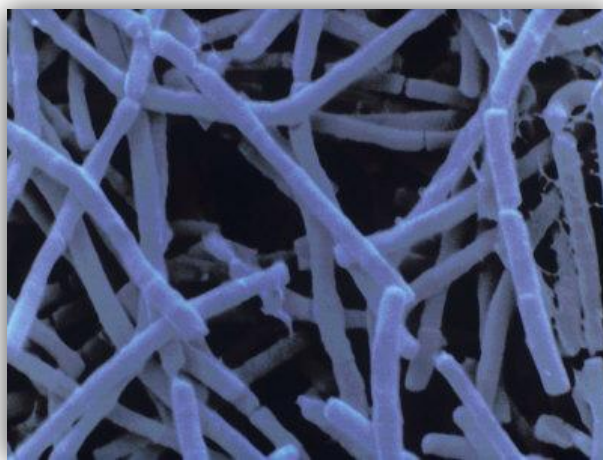


Figure n°5 : Aspect de *Bacillus cereus* en microscopie électronique.
(<http://www.art.com>)

III.6- *Enterococcus faecalis* :

Les Entérocoques sont des bactéries à métabolisme anaérobie, dites cocci à Gram positif, se présentent habituellement sous forme de chaînettes. Ce sont des pathogènes opportunistes causant des septicémies, infections urinaires ou abdominales d'origine intestinale. Ils sont la cause de plus de 10 % des infections nosocomiales (Bouvet, 2010).

Pendant très longtemps, les Entérocoques ont été classés au sein du genre *Streptococcus* jusqu'en 1984 où une analyse du génome indiqua qu'il était plus approprié de créer le genre *Enterococcus*. Cet amalgame est notamment dû au fait que les entérocoques possèdent l'antigène de paroi D. Le genre *Enterococcus* peut se cultiver sur un milieu hyper salé (6,5 % NaCl). Les deux principales espèces sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ils sont assez résistants aux acides, ce qui leur permet de passer la barrière stomacale (Bouvet, 2010).

Dans l'eau potable, ce sont des indicateurs de contamination fécale, comme les colibacilles. Leur nom le rappelle (entérique + coque), ils font partie de la flore commensale et se retrouvent notamment dans le tractus digestif et génito-urinaire (dont urètre) (Bouvet, 2010).



Figure n°6 : Aspect d'*Enterococcus faecalis* en microscopie électronique.
(http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Enterococcus_faecalis_SEM_01_Detail.png)

L'effet antagonisme des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes ou d'altération peut être du à plusieurs facteurs, parmi eux l'acide et les bactériocines.

Dans cette étude une souche *Lactococcus lactis subsp lactis* est mise en interaction avec des bactéries pathogènes et d'altération de la collection du laboratoire LAMAABE et qui sont :

Tableau 4 : Bactéries utilisés et leur origine.

Les souches	Genres et espèces	Code	Origine
Bactéries pathogènes	<i>Escherichia coli</i>	ATCCP25922	Collection des Souches du laboratoire L.A.M.A.A.B.E
	<i>Bacillus cereus</i>	/	
	<i>staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19145	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	
Bactérie lactique	Lactococcus lactis ssp lactis	S93 Identifiée par PCR	

I. Préparation des souches :

- **Bactérie lactique :**

La souche lactique était conservée à – 20°C dans des tubes Eppendorf contenant du glycérol. Elle est revivifiée dans un bouillon M17 puis incubées à 30°C pendant 48 h.

- **Bactéries pathogènes:**

Les bactéries pathogènes étaientensemencées dans des tubes inclinées contenant la gélose nutritive. Elles sont réensemencées dans un bouillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24h.

II. Mise en évidence de l'effet antagoniste :

II.1- Méthode en profondeur :

1 ml de la culture lactique S93 de 48h estensemencé en profondeur puis 15 ml de gélose M17 en surfusion sont coulés. Après solidification, des spots de la bactérie pathogène sont déposés à la surface de la boîte de pétri.

Après séchage une couche mince d'une gélose semi-solide est coulée puis la boîte est incubée à 30°C pendant 24h.

II.2- Méthode de Fleming et al (1985) :

Cette méthode consiste à ensemencer en spot la culture lactique S93 de 48h sur une gélose M17. Après séchage 8ml d'une gélose semi-solide en surfusion sont coulés à la surface de la boîte additionnée de 500 µl d'un bouillon nutritif contenant la bactérie nuisible. On laisse se solidifier puis on incube à 37°C pendant 24h.

Le résultat se traduit par l'apparition des zones d'inhibitions.

III. Détermination du facteur inhibiteur :

Pour déterminer le facteur inhibiteur la méthode de Fleming et al (1985) est appliquée. Le surnageant de la bactérie lactique obtenu après centrifugation à 3000 tr/mn pendant 30 minutes estensemencé en spot à la surface du milieu M17 solide.

▪ *Facteur acide :*

Le surnageant est neutralisé à pH = 6,7 avec du NaOH (0,1N), puisensemencé en spot sur la Gélose M17, après un temps de séchage, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h.

Puis 500 µl d'une culture pathogène prise d'un bouillon nutritif de 24h et rajouté à 8 ml d'une gélose semi-solide, le mélange est coulé à la surface de la boîte puis incubé à 37°C pendant 24 h.

Des boîtes témoins sontensemencées avec du surnageant non neutralisé.

- ***Facteur bactériocines :***

Les bactériocines sont des substances de nature protéique. Pour savoir si la souche lactique S93 produit cette substance, une enzyme de nature protéique (la pepsine) est testée en utilisant toujours la méthode de Flemming et al ; (1985). Le surnageant est neutralisé pour éliminer l'effet de l'acide puis il estensemencé en spot. Après incubation à 30°C pendant 24h, le mélange de la gélose semi-solide en surfusion contenant 500 µl d'une souche pathogène et 10mg/ml d'enzyme (pepsine) est coulé. Après solidification les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.

Des boites témoins sont utilisées sans enzyme.

Le résultat obtenu consiste à comparer les diamètres d'inhibitions en présence et en absence d'enzyme.

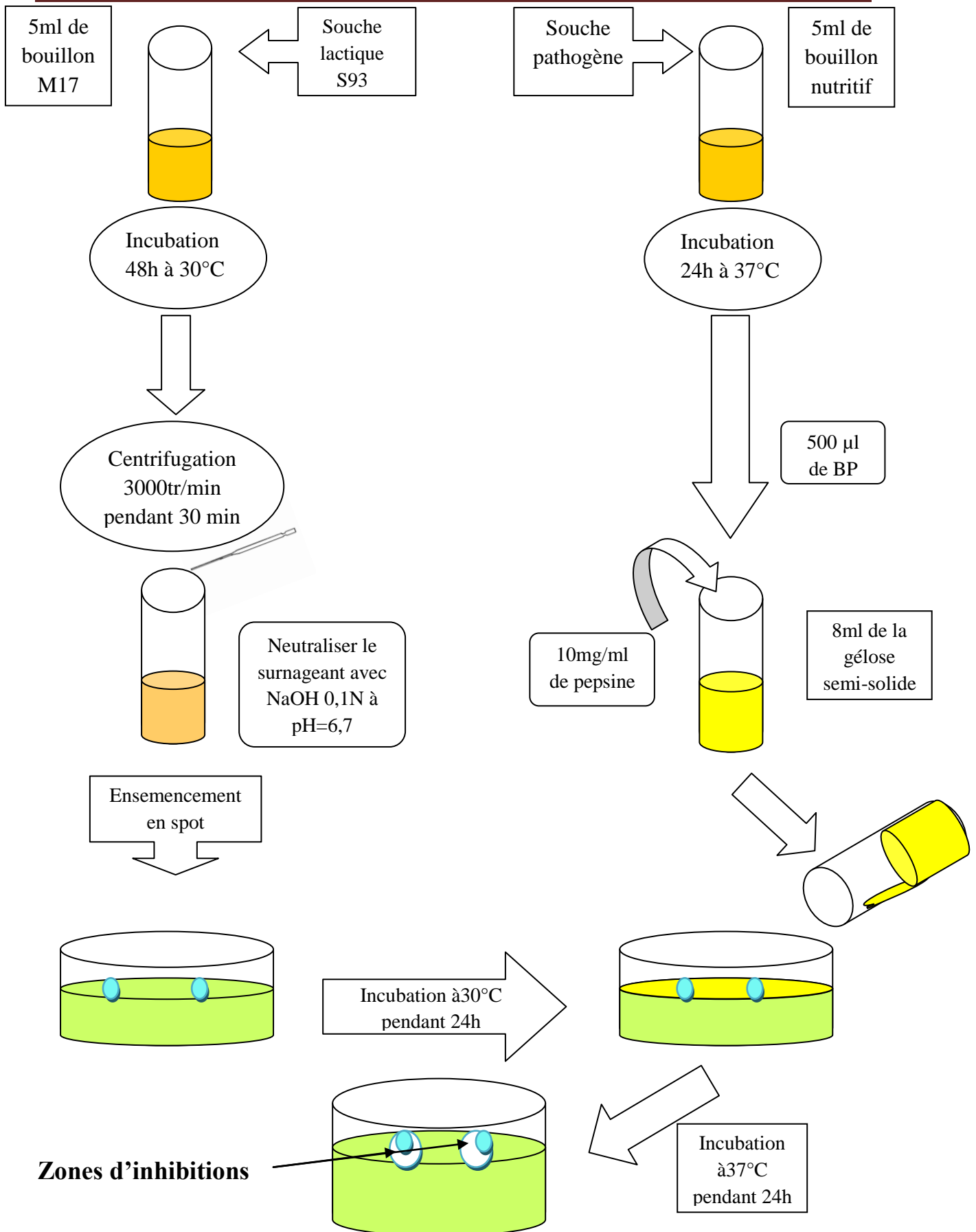


Figure n°7 : Schéma représentatif de la méthode de Fleming et al (1985)

VI. Effet bactéricide ou bactériostatique :

Pour savoir si la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* inhibe les bactéries pathogènes par effet bactéricide ou bactériostatique deux procédés sont réalisés :

- **Le premier procédé :** consiste à découper un fragment de gélose dans la zone d'inhibition puis le mettre dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif. Après incubation à 37°C pendant 24h, l'apparition de trouble dans le tube permet de déduire que l'effet inhibiteur est bactériostatique, si le tube reste clair cela veut dire que les bactéries ont été tuées donc l'effet est bactéricide.
- **le deuxième procédé :** Le fragment est étalé à la surface d'une gélose nutritive. Après incubation de 24h à 37°C s'il y a absence des bactéries l'effet est bactéricide, s'il y a croissance l'effet est bactériostatique.

V. Durée de vie d'une bactérie pathogène en interaction avec la souche S93 :

L'interaction est réalisée en utilisant du lait écrémé.

- **Préparation du lait :**

Deux bactéries pathogènes *Listeria* et *Bacillus* sont étudiées, 48g de poudre de lait sont mélangés avec 400 ml d'eau distillée puis chauffer et laisser en ébullition durant 15 min. Deux flacons sont remplis à raison de 200 ml chacun puis autoclavés pendant 20 min.

- **Ensemencement des bactéries :**

Après refroidissement chaque flacon est ensemencé avec 0,5 % de la souche S93 de 48h et 0,5 % d'une souche pathogène de 24h.

Après 2h on procède à des dilutions jusqu'à 10^{-6} et on ensemence en masse les trois dernières dilutions 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} dans des géloses M17 pour la bactérie lactiques est gélose nutritive pour la bactérie nuisible.

Le mélange est remis à l'étuve, nous diminuons la dilution chaque 2 h jusqu'à la solution mère et obtention de la disparition total des bactéries pathogènes.

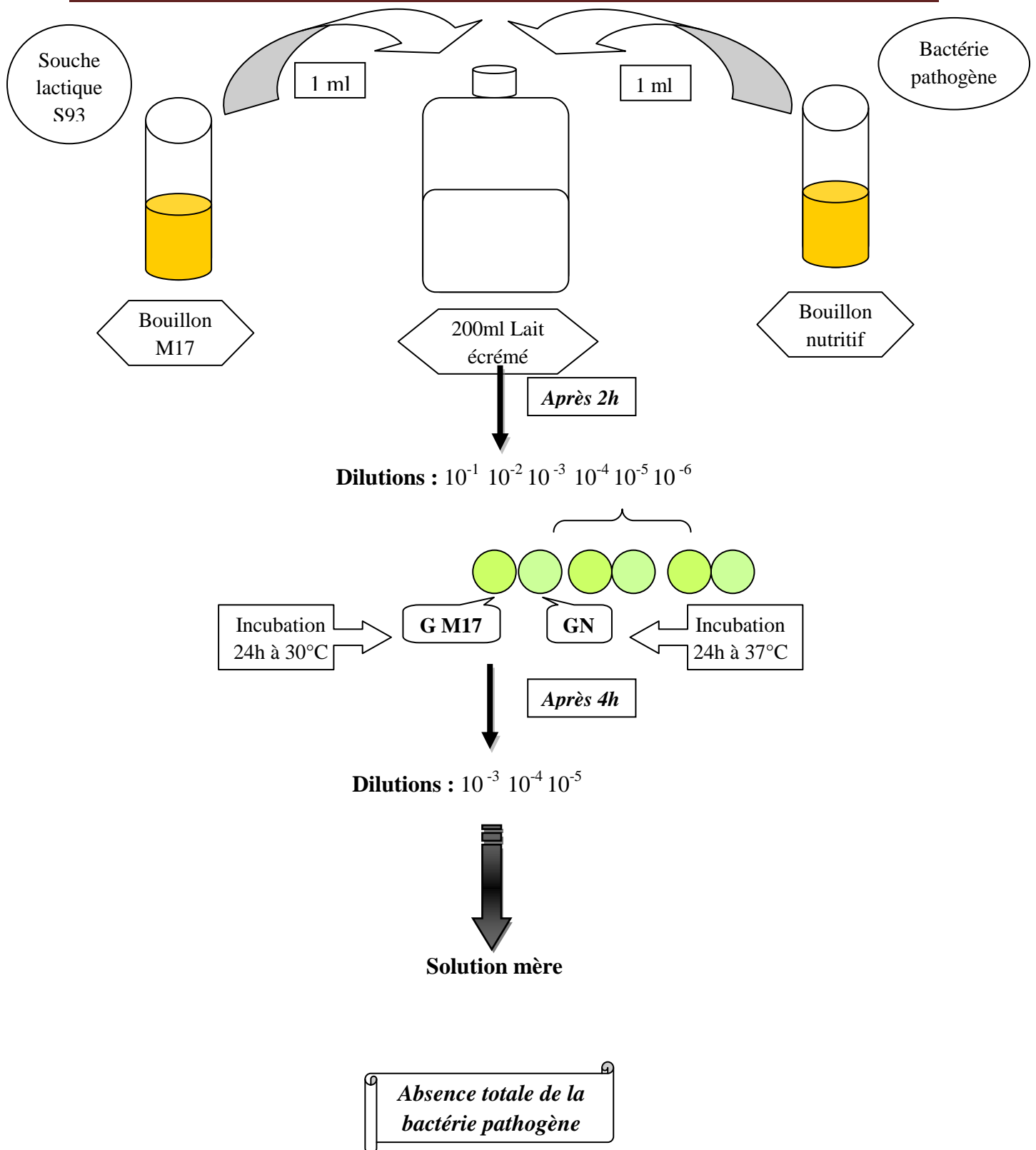


Figure n°8 : Durée de vie d'une souche lactique et souches pathogènes ensemencées en interaction dans le lait écrémé.

I. Détection de l'effet antagoniste :

Les résultats de la méthode en profondeur ne sont pas apparents

La méthode de Flemming et *al* (1985) a montré les résultats suivants :

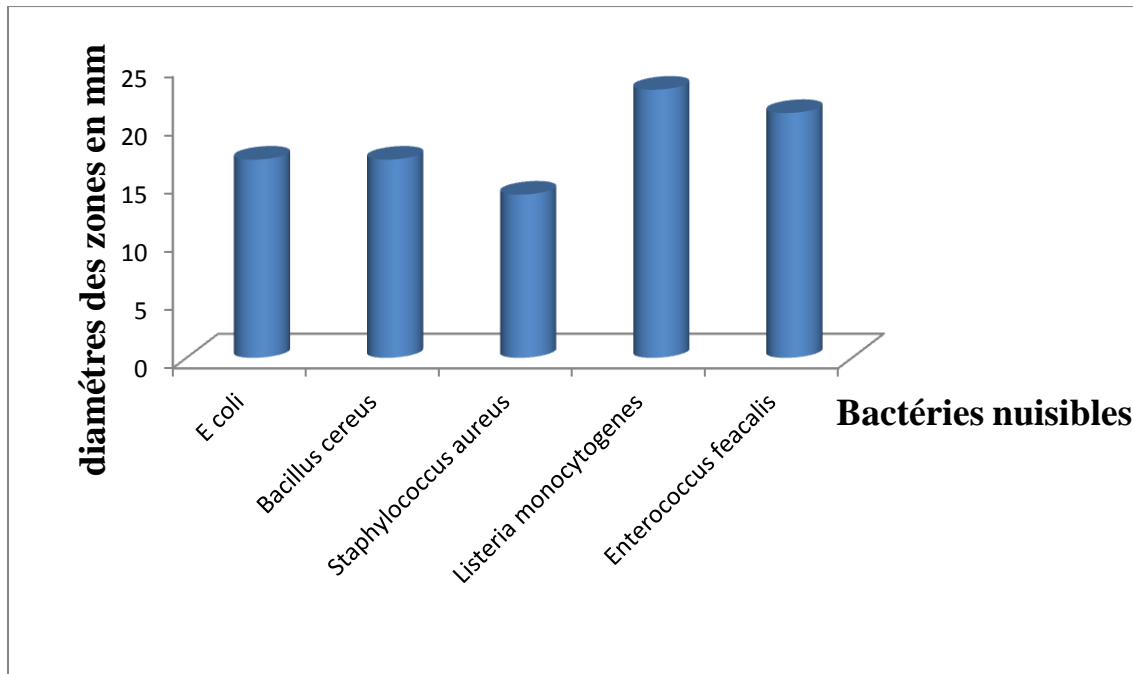


Figure n°9 : Diamètres d'inhibitions formées par la souche S93 confronter avec les bactéries nuisibles.

La souche S93 a une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altérations qui se traduisent par l'apparition des zones d'inhibitions.



Figure n°10 : Zone d'inhibitions de S93 vis-à-vis *E. Coli*

II. Détermination de la nature de l'inhibition :

L'effet antagoniste des bactéries lactique vis-à-vis des bactéries pathogènes est dû à plusieurs facteurs tels que : l'acide organique, les bactériocines... etc.

Pour déterminer la nature du facteur inhibiteur on a procédé de la façon suivante :

II.1-Inhibitions dû à l'acide :

L'effet inhibiteur de la souche S93 en produisant l'acide a donné les résultats suivants :

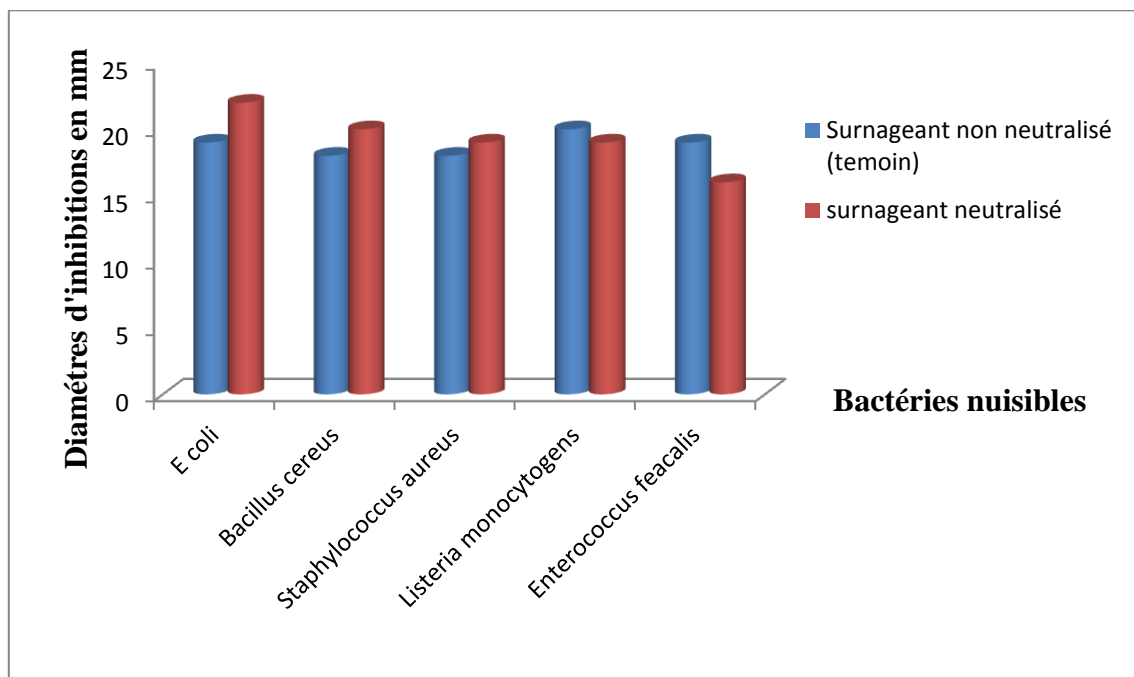


Figure n°11: Inhibition par l'acide des bactéries pathogènes.

L'acide produit par S93 agit seulement sur *Listeria* et *Enterococcus*.

L'apparition des zones d'inhibition pour les autres bactéries montre l'effet d'autres facteurs inhibiteurs.

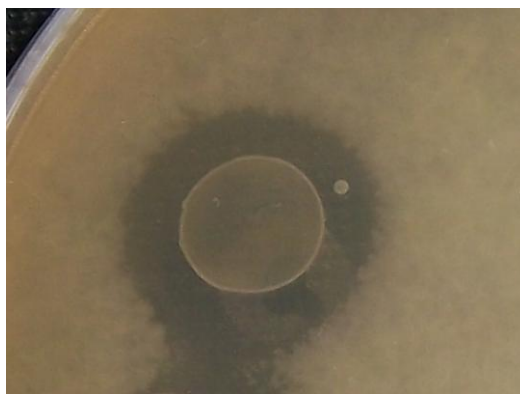


Figure n° 12: Zone d'inhibition dans le milieu neutralisé : *E .coli*.

II.2-Inhibition dû aux bactériocines :

Les bactériocines sont des peptides antibactériens qui présentent un spectre étroit envers des espèces pathogènes, elles sont inactivées par les protéases. Pour cela une enzyme protéolytique qui est la pepsine est testée pour savoir si la souche S93 produit des bactériocines ou non.

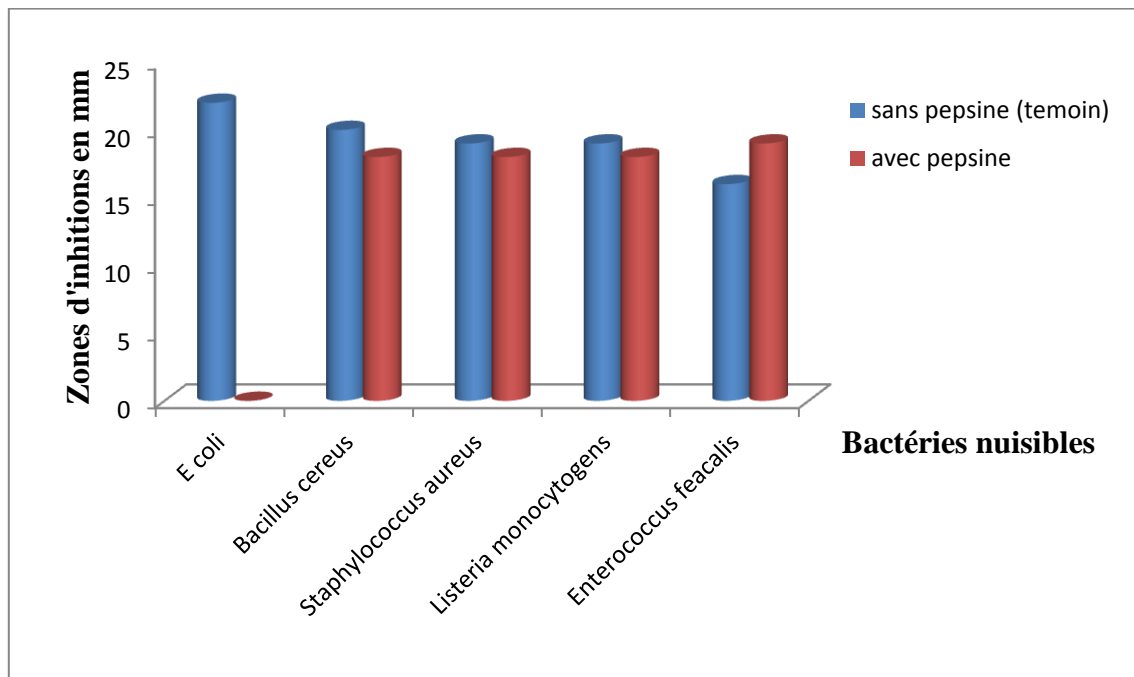


Figure n°13: Inhibition des bactéries pathogènes par S93 en utilisant la pepsine.

La souche S93 synthétise une bactériocine sensible à l'action de la pepsine et qui agit fortement sur *E. coli*.

Pour le cas de *S.aureus*, *B.cereus* et *Listeria* les zones d'inhibitions ont diminué dans le milieu avec enzyme par rapport au milieu sans enzyme. Probablement il existe une autre bactériocines de nature glycoprotéique ou lipoprotéique qui n'a pas agit sur *Enterococcus*.

La zone d'inhibitions dans le milieu avec pepsine est supérieure à celle du milieu sans pepsine dont le cas d'*Enterococcus* on peut déduire qu'il y a d'autres facteurs inhibiteurs.

III. Effet Bactéricide ou Bactériostatique :

L'acide, les bactériocines et les autres facteurs inhibiteurs produits par S93 ont un effet bactériostatique puisqu'il y a apparition de troubles dans les bouillons nutritifs et une croissance importante de colonies à la surface des géloses.



Figure n°14 : Effet bactéricide ou bactériostatique.

IV. Durée de vie d'une bactérie nuisible en interaction avec S93:

L'interaction entre la souche S93 et une bactérie nuisible en culture mixte dans le lait écrémé apparaît varié au cours du temps.

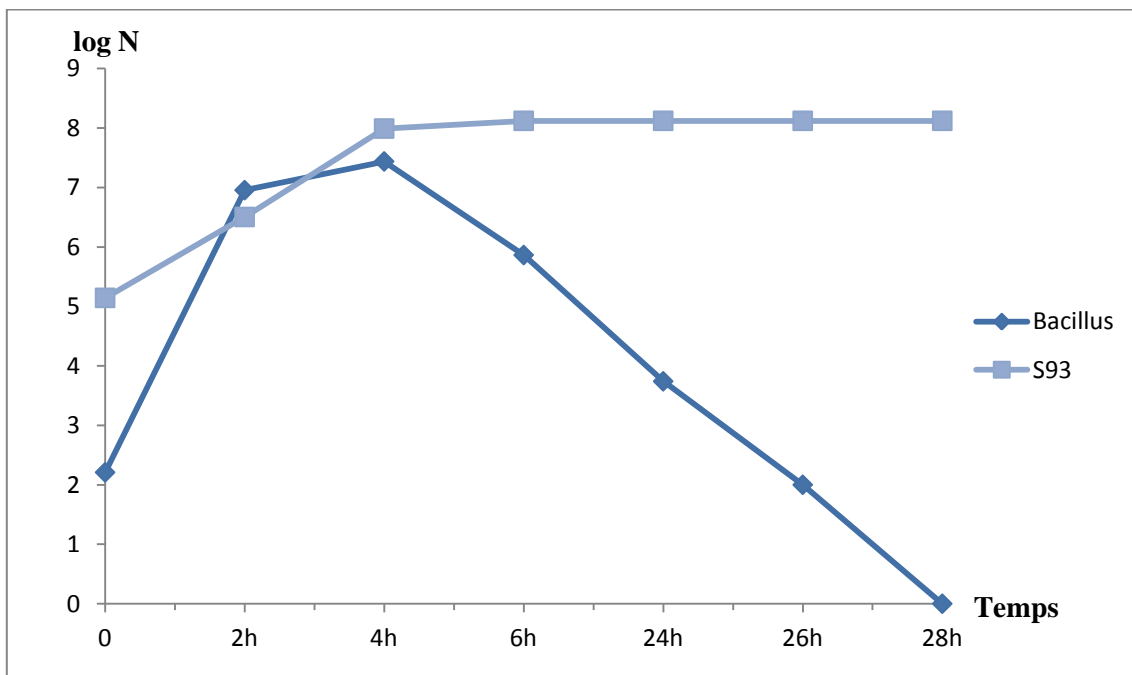


Figure n°15: Cinétique de croissance de la souche S93 et *Bacillus* en interaction dans le lait écrémé

En présence de la souche S93, *Bacillus* croit rapidement pendant 2h puis très lentement jusqu'à 4h ou il y a décroissance rapide du taux jusqu'à disparition totale à 28h.

La souche lactique croit pendant 6h puis reste stationnaire.

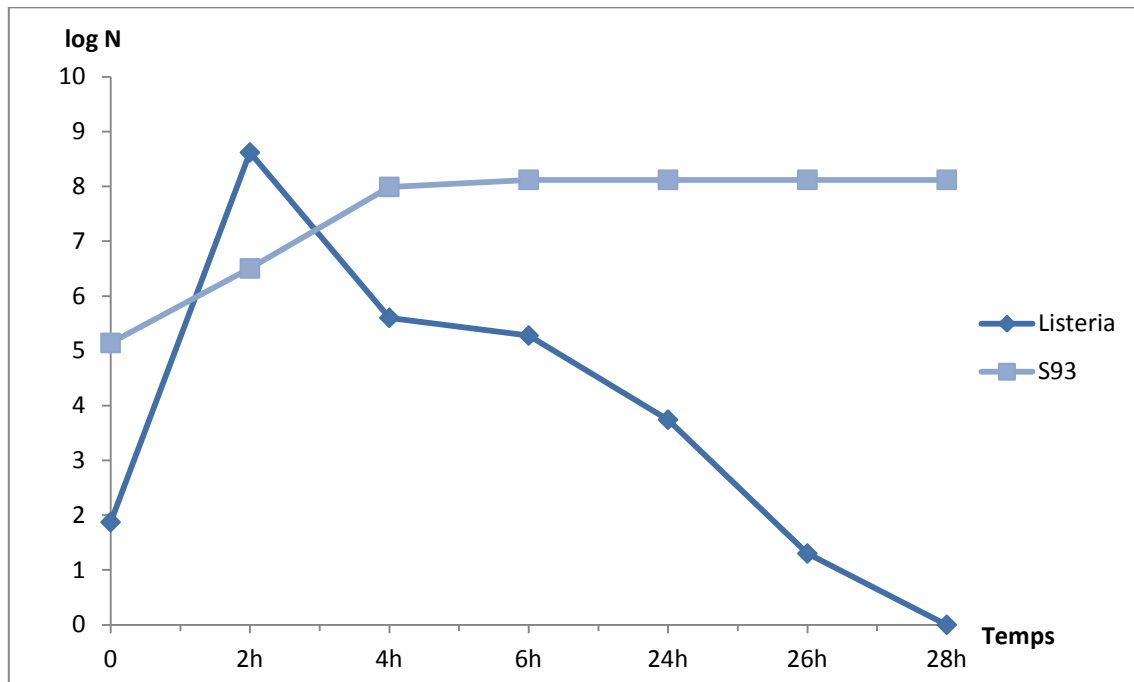


Figure n°16: Cinétique de croissance de la souche S93 et Listeria en interaction dans le lait écrémé

Pour l'espèce *Listeria*, la croissance maximale est atteinte au cours des deux premières heures, puis un déclin est remarqué conduisant la bactéries à disparaître totalement à 28h.

La souche lactique croit, après 6h un état stationnaire s'installe.

Les Bactéries lactiques sont connues pour leur capacité d'inhiber dans les aliments, le développement des Bactéries Pathogènes et d'altérations. (Fang et al, 2006 ; Zdolec et al, 2007), par la production d'une grande variété de substances antimicrobiennes (Achemchem, 2004).

Dans notre étude, la recherche de l'effet inhibiteur des bactéries pathogènes par la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* (S93) a permis de mettre en évidence le pouvoir antagoniste de cette souche.

L'effet antagoniste de S93 vis-à-vis des bactéries nuisibles a été détecté par l'application de la méthode de Flemming et al (1985) (Fig n°9).

L'action inhibitrice de S93 par production d'acide est remarquée chez *Enterococcus* et *Listeria* seulement, d'autres facteurs inhibiteurs interviennent pour toutes les bactéries nuisibles (Fig n°11).

D'après Song et al (1997) l'élimination de l'effet des acides organiques favorise plutôt l'activité des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines. Selon Savadogo et al (2004), la plupart des souches bactériennes inhibées par les bactéries lactiques ou leurs bactériocines sont des Gram (+) qui sont plus sensible que les Gram (-) et que les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques sont inactifs par les enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine et chymotrypsines) ce sont les inhibiteurs de nature protéique et qui ont une caractéristique générale des bactériocines,

Dans cette étude la pepsine est choisie comme enzyme protéolytique pour tester la sensibilité de la bactériocine.

Les résultats obtenus ont montré que la souche S93 secrète des bactériocines qui agissent sur toutes les bactéries pathogènes et d'altération, l'une de nature protéique sensible à la pepsine qui a inhibé totalement *E. coli* ceci confirme les travaux de Vinod Kumar et al (2006) à savoir que la souche *Lactococcus lactis* possède une activité antimicrobienne contre plusieurs espèces Gram négative. Et une autre bactériocine de nature glycoprotéique ou lipoprotéique qui agit sur les autres bactéries nuisibles puisqu'il y a seulement diminution des zones d'inhibition (Fig n°13). Certaines molécules de sucre ou de lipides peuvent se joindre à ces protéines, les molécules formées ne sont pas indispensables à l'inhibition Savadogo et al (2004).

D'après Lewis et al (1991) in Chikhi et Hadj Abdelkader (2009) parfois l'action des enzymes protéolytique n'élimine pas mais diminue légèrement l'inhibition, ceci, montre que l'agent antagoniste contient seulement un composé mineur de caractère protéique, c'est le cas des bactériocines de nature glycoprotéique ou lipoprotéique.

La non diminution des zones d'inhibitions dans le milieu avec pepsine pour *Enterococcus* est du à l'existence d'autres facteurs inhibiteurs.

L'effet antagoniste des bactéries lactiques est attribué aussi aux bactériocines qui leur sont propre et ayant un effet bactéricide ou bactériostatique.

La souche (S93) a un effet bactériostatique sur toutes les bactéries nuisibles testées (Fig n°14).

D'après Hechard et *al* (1993), la bactériocine mésentéricine Y105 a un effet bactéricide, Krier et Germain (1998) ont montré aussi que la mésentéroïne 52B a aussi un effet bactéricide par contre, Jasniewski (2008) a trouvé que le mode d'action de la mésentéroïne 52A est bactériostatique à faible concentration mais à très forte concentration l'effet est bactéricide.

Bacillus cereus et *Listeria monocytogenes* trouve le lait comme milieu favorable pour le développement, après une phase de croissance pendant 2h pour *Listeria* puis un léger état stationnaire pour *Bacillus cereus*, les deux bactéries nuisibles commencent à décroître jusqu'à disparition totale à 28h suite à l'action des métabolites produits par la souche lactique S93. (Fig n°15,16)

Conclusion générale

L'étude de l'effet inhibiteur de la souche lactique S93 appartenant à la sous espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altération en appliquant la méthode de Flemming et *al* (1985) a montré qu'elle agit par action antagoniste.

Cette action est due à la production des composés à activité antimicrobienne, comme l'acide qui agit sur *Listeria* et *Enterococcus* mais à faible concentration.

La souche S93 produit au moins deux bactériocines, l'une sensible à la pepsine qui agit sur *E. coli*, l'autre de nature glycoprotéique ou lipoprotéique qui a inhibé les autres bactéries. D'autres substances et facteurs inhibiteurs sont produits par la bactérie lactique.

Tous ces métabolites sécrétés par la souche S93 ont une action bactériostatique et ont permis la disparition complète de *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* après 28h lorsque S93 est en interaction avec ces bactéries dans le lait.

La souche S93 peut être utilisée dans les industries agro alimentaires pour cela nous recommandons dans l'avenir :

- ✓ Confirmer la présence des bactériocines de nature glycoprotéique ou lipoprotéique.
- ✓ Rechercher la nature exacte des autres facteurs inhibiteurs.

Résumé

Les bactéries lactiques sont très utilisées en industrie agro alimentaire grâce à leur rôle dans la fermentation et la conservation des aliments par production de plusieurs facteurs inhibiteurs tel est l'objectif de ce travail qui consiste à rechercher le pouvoir antagoniste de la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* (S93) vis-à-vis les bactéries pathogènes et d'altération.

La méthode de Flemming et al (1985) a permis de déduire que la souche S93 produit l'acide organique et deux bactériocine, l'une de nature protéique qui agit sur *E. coli* et l'autre de nature glycoprotéique ou lipoprotéique qui agit sur les autres bactéries nuisibles. D'autres facteurs inhibiteurs sont produits par la souche lactique S93.

Notre étude a montrée que l'effet inhibiteur de la souche S93 vis-à-vis les bactéries nuisibles est bactériostatique.

L'étude du pouvoir antagoniste de la souche S93 a montré que cette dernière inhibe *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* après 28h.

Mots clés : *Lactococcus lactis* S93, bactéries lactiques, bactéries pathogènes, bactériocine, acide lactique, inhibition, antagonisme.

Annexe 1 :**Tableau 1: Zones d'inhibition montrant l'effet antagonisme de la souche S93 (mm).**

Souches pathogènes	Diamètres d'inhibitions (mm)
<i>E. coli</i>	17
<i>Bacillus cereus</i>	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
<i>Listeria monocytogenes</i>	23
<i>Enterococcus faecalis</i>	21

Tableau 2: Zones d'inhibition formées par le surnageant de la souche S93 neutralisé et non neutralisé (mm).

Souches pathogènes	Surnageant non neutralisé (Témoin)	Surnageant neutralisé
<i>E. coli</i>	19	22
<i>Bacillus cereus</i>	18	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	19
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	19	16

Tableau 3: Zones d'inhibition en mm formées par le surnageant de la souche S93 avec pepsine et sans pepsine.

Souches pathogènes	Sans pepsine (témoin)	Avec pepsine
<i>E coli</i>	22	0
<i>Bacillus cereus</i>	20	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	18
<i>Listeria monocytogenes</i>	19	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	16	19

Tableau 4: Dénombrement de *Bacillus* sur gélose nutritive en interaction avec S93 dans le lait écrémé.

Dilutions Temps	Solution Mère	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T=0	162						
2h					32	15	09
4h				37	IND	274	
6h			18	12	73		
24h		43	55				
26h		10					
28h	0	0					

Tableau 5: Dénombrement de *Bacillus* en log N.

Dilutions Temps	Solution Mère	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T=0	2,209						
2h					5,505	6,176	6,954
4h				4,568	IND	7,437	
6h			3,255	4,079	5,863		
24h		2,633	3,740				
26h		2					
28h	0	0					

Tableau 6: Dénombrement de *Listeria* sur gélose nutritive en interaction avec S93 dans le lait écrémé.

Dilutions Temps	Solution Mère	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T=0							
2h					IND	IND	416
4h				31	20	4	
6h			61	22	19		
24h		12	53				
26h		2					
28h	0	0					

Tableau 7: Dénombrement de *Listeria* en log N.

Dilutions Temps	Solution Mère	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T=0							
2h					IND	IND	8,619
4h				4,491	5,301	5,602	
6h			3,785	4,342	5,278		
24h		2,079	3,742				
26h		1,301					
28h	0	0					

Annexe 2 :

Les milieux de culture utilisée dans notre étude :

➤ **Bouillon M17**

44.75g dans un litre d'eau distillée

PH=7.2±0.1

Autoclaver 15 minutes à 121°C.

➤ **Gélose M17**

37.75g dans un litre d'eau distillé

PH=7.2±0.1

Autoclaver 15 minutes à 121°C.

➤ **Bouillon nutritive**

20g dans un litre d'eau distillée

PH=7.2

Autoclaver 15 minutes à 121°C.

➤ **Gélose nutritive**

39g dans un litre d'eau distillée

PH=7.3±0.2

Autoclaver 15 minutes à 121°C.

➤ **Gélose semi-solide**

14g de bouillon +20g de gélose pour un litre d'eau distillée

Autoclaver 15 minutes à 121°C.

Références bibliographique

Achemchem F., Abrini, J., Marinez-bueno M., Valdivia E et Maqueda M. (2004). Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus Faecium* F-420 isolée à partir de lait cru de chèvre. Biotechnologie. Congrès international de biochimie. Marrakech. Département de biologie. Université Abd Elmalek. Tétouan – Maroc.

Adams, M. R. et Hall, C. J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. International Journal of Food Science and Technology 23, 287-292.

Ahamad, N. et Marth, E. H. (1989). Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. Journal of food protection 52, 688-695.

Ait Belghanaoui A. (2006). Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse pour obtenir ingénieur d'état en biologie. Option : contrôle de qualité et analyses , 2011.

Akerberg, C.; Hofvendahl, K.; Zacchi, G. and Hahn-Hagerdal, B. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentration on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, vol. 49, no. 6, p. 682-690.

Bharat R. (1996). Bactéries anaérobies facultatives culture fécale.

B.Patel@sct.gu.edu.au>HTML'd par Troy Baalham . [Créé 12 Septembre 1995, Modifié 20 Mai 1996]

http://translate.google.com/translate?hl=fr&sl=en&u=http://trishul.sci.gu.edu.au/courses/ss12/bmi/micro_groups/fac_anaerobes.html&prev=/search%3Fq%3DE.coli%2Bin%2Bthe%2Bnormal%2Bfecal%2Bflora%2Bof%2Banimals%26start%3D10%26hl%3Dfr%26lr%3D%26sa%3DN.

Bailey JE, Ollis DF. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2ème Edition, McGraw-Hill, Singapore.

Boonmee, Mallika; Leksawasdi, Noppol; Bridge, Wallace and Rogers, Peter. Batch and Continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. Biochemical Engineering Journal, 2003, vol.14, no. 2, p. 127-135.

Bouvet A. (2010). Centre National de référence des streptocoques, Hôtel Dieu, Université Paris VI ; cour en ligne archive de bactériologie générale ; Streptocoques-Entérocoques.

Références bibliographique

Callewaert T. and De Vuyst L. (2000). Bacteriocin production with *L. amylovorus* DCE471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2) : 606-613.

Caplice, E., Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2), 131-149.

Carmen, M ; Jan Kok, EH ; Pelaez, C ; Requena, T et Buist G. (2000). *Applied and Environmental Microbiology*, Aug., Pp: 3174-3179.

Chang, Dong-Eun; Jung, Heung-Chae; Rhee, Joon-Shick and Pan, Jae-Gu.

Homofermentative production of D- or L-Lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, no. 4, p. 1384-1389.

Chikhi et Hadj Abdelkader. (2009). Inhibitions par les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* isolées du lait de chèvre et de brebis et recherche des bactériocines. Mémoire de Fin d'Etudes en vue d'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en Biologie. Option : contrôle de qualité et analyses. Université de Tlemcen.

Collins, M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and A. M. Williams. (1989). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *vagococcus fluvialis* gen. nov. sp. nov. *Journal of applied Bacteriology* 67, 453-460.

Dellaglio, Fe, de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., & Janssens, D.

(1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans : H. de Roissart & F. M. Luquet (éds). *Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques*, vol 1, (pp.25-116).

Doleyres Y. (2002). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technique des cellules immobilisées. *Faculté des études supérieures de l'université Laval Québec*. Pp : 5-8.

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

Do-Won, Jeonga; Youn Chul, Choia; Jung Min, Leea; Jeong Hwan, Kimb; Jong-Hoon, Leec; Kyoung Heon, Kimd and Hyong Joo Leea. Isolation and characterization of promoters from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LM0230. *Food Microbiology*, February 2006, vol. 23, no. 1, p. 82-89.

Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4), 639-654.

Références bibliographique

- El Atyqy. (2010).** Intoxications et toxi-infections alimentaires bactériennes.
<http://www.azaquar.com/doc/intoxications-et-toxi-infections-alimentaires-bactriennes>
- El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J., Jakobsen, M. (1998).** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20(10), 913-916.
- Esther Izquierdo Alegre. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Strasbourg. Spécialité, chimie analytique. N° d'ordre 136.
- Fang W, Bjora Budde B & Siegumfeldt H (2006).** Leucocins 4010 From *Leuconostoc canosum* cause a matrix related decrease in intracellular pH of *Listeria monocytogenes*. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Zhejiang, China and Department of Food Sciences, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg C, Denmark.
- Fuqua, C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1996).** Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50: 727-751.
- Hécharde Y., Renault O., Cenatiempo Y., Letellier F., Maftah A., Jayat C., Bressolier C., Ratinaud M., Julien R., Fleury Y., Delfour A. (1993).** Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines Bacctériocines – Taxonomie ; Elsevier/INRA.
- Hennekinne Jacques-Antoine. (2009).** Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à Staphylocoques à coagulase positive. THÈSE pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Holzappel, W. H., Geisen, R. et Schillinger, U. (1995).** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Hujanen, M. and Linko, Y-Y.** Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, vol. 45, no. 3, p. 307-313.
- Jasniewski J (2008).** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe Ha. Mémoire de Fin d'Etudes pour l'obtention du Grade de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Jensen, P.R. and Hammer, K.** Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, vol. 59, no. 12, p. 4363-4366.

Références bibliographique

Kaiser Gary .E. (1998). Escherichia coli entérobactériaceae : les bacilles fermentatifs, gram-négatifs, entériques microbiologie De Doc. Kaiser copyright septembre 23, 1998.
http://216.239.37.104/translate_c?hl=fr&u=http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanual/lab2/sedimentturbidity.html&prev=/search%3Fq%3DE.coli%2Bin%2Bthe%2Bnormal%2Bfecal%2Bflora%2Bof%2Banimals%26hl%3Dfr%26lr%3D.

Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337-349.

Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, de Vos WM. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol. 24 : 895-904.

Labioui H., Laroussi E., El Yachioui M. et Ouhssine M., (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin Soc Pharm. Bordeaux, 144 : 237-250.

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

Nehem Nancy. (2008). Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. . THÈSE pour obtenir le titre de Docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse. Spécialité : Génie des procédés et Environnement.

Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. Yeast. 20: 331-341.

Novel, G. (1993). Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.

Oh, D. H. et Marshall, D. L. (1993). Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 20, 239-246.

Philippon A. (2004). Relation hôte pathogène faculté de médecine Cochin-Port-Royal, Université PARIS V.

Papa Abdoulaye Fall. (2011). Études des interactions entre une bactérie bioprotectrice, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, et *Brochothrix thermosphacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale. Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE NANTES

Références bibliographique

Raynaud, S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse pour obtenir le grade de docteur. Spécialité : Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.

Roissart, H. and Luquet F.M. Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Uriage, Lorica, France, **1994**, vol. 1, p. 605. ISBN 2 9507477 0 1.

Salminen, S. and Von Wright, A. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Ltd., New York, **1993**. 442 p. ISBN: 0824789075.

Savado A, Ouattara C. A.T., Bassole I.H.N., Traore A.S. (2004). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie.

Scheleifer, K., Kraus, J., Dvorak, C., Kilper-Baelz, R., Collins, MD. And Fisher, W. (1985). Transfer of streptococcus lactis and related streptococci to the genus lactococcus gen. Nov. Systematic and Applied Microbiology 6, 183-195.

Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. et van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. Applied and environmental microbiology 74, 4997-5007. August 15, 2008.

Song (H.J.), Richard J. (1997). Anti-Listeria activity of three bacteriocins used at sub minimal anhibitory concentration and cross-resistance of the surveveros. Int.J. Food Microbiol. 36 (2), 155-161.

Boutrif O, Diop E, A.M.C. (2010). Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie. Spécialité : contrôle de qualité et analyses.

Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. Archives of Biochemistry and Biophysics 373, 1-6.

Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. Journal of Applied Microbiology 91, 147-153.

Van Niel, E.W.J. and Hahn-Hagerdal, B. Nutrient requirements of Lactococci in defined growth media. Applied Microbiology and Biotechnology, **1999**, vol. 52, no. 5, p. 617-627.

Vinod Kumar J., Somesh S. et Neerja S., (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (3) : 435-439.

Vollenweider, S. (2004). 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotech. 64, 16-27.

Références bibliographique

Ziadi, M.; Touhami, Y.; Acchour, M.; Thonart, Ph. and Hamdi, M. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of Lactococcus. Biochemical Engineering Journal, **2005**, vol. 24, no. 2, p. 141-145.

Zdolec N, Kozaeinski L, Hadziosmanović M, Cvrtila Z, and Filipović I (2007). Inhibition of Listeria monocytogenes growth in dry fermented sausages. Department of hygiene and technology of animal Foodstuffs, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia.

www.cniel.com /publicat/Questions_sur/pdf/QS_30.pdf. (2009). Les bactéries lactiques, ferments de la vie.

www.bacterio.cict.fr.

www.ummtto.dz.