

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et la recherche scientifique Université Abou bakr
Belkaid
Faculté des Sciences
Département de biologie moléculaire et cellulaire

Master: 23/01
04236
13/12/09

Laboratoire de contrôle de qualité et analyses

MEMOIRE

De fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie moléculaire et cellulaire

Option : Microbiologie



THEME

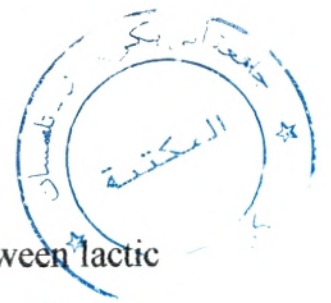
Antagonisme entre les bactéries mésophiles et les bactéries lactiques du genre Lactococcus isolées du lait de jument et recherche des bactériocines

Présenté par : **BELABBES Souad**

Soutenu le 03/11/2009 devant le jury

- ✦ Présidente : Mme Belarbi .M Professeur
- ✦ Examinatrice : Mme MALEK. F Maitre assistante
- ✦ Examineur : Mr Aribi. M Maitre de conférences .A
- ✦ Promotrice : Mme BENDIMERAD. N Maitre assistante

Année universitaire : 2009/2010



Abstract

This work is revealed the existence of antagonistic effect between lactic strains of the genus *Lactococcus* sp mare's milk and pathogenic species by investigating the inhibitory factors produced by these bacteria, which can be organic acids, phages, hydrogen peroxide or bacteriocins.

All pathogens were inhibited by lactic strains tested secrete organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins but not lodge phages.

All strains belonging to lactic *Lactococcus lactis* and *Lactococcus diacetylactis* one produce two types of bacteriocins one is sensitive to pepsin and the other to a proteinase, they also produce bacteriocins such as glycoprotein and // or lipoprotein. They operate on 90% of pathogenic bacteria.

Most strains of lactic acid have a bacteriostatic effect on pathogenic flora.

Interactions between strains of *Lactococcus* can be achieved, and the self-inhibition except for strain Lclj3.

All pathogens showed a significant sensitivity to nisin as zones of inhibition ranging from 9 mm to *Enterobacter* up to 18 mm for *Bacillus cereus* of collection.

Keywords: Lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, *Lactococcus*, inhibition, antagonism, nisin.

Résumé

Ce travail consiste à montrer l'existence de l'effet antagoniste entre les souches lactiques du genre *Lactococcus sp* du lait de jument et des espèces pathogènes en recherchant les facteurs inhibiteurs produits par ces bactéries lactiques ; qui peuvent être des acides organiques, des phages, du peroxyde d'hydrogène ou des bactériocines.

Toutes les bactéries pathogènes ont été inhibées par les souches lactiques testées en secrètent des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines mais elles n'abrident pas de phages.

L'ensemble des souches lactiques appartenant aux *Lactococcus lactis* et *Lactococcus diacétylactis* produisent deux types de bactériocines l'une est sensible à la pepsine et l'autre à une protéinase, elles produisent aussi des bactériocines de nature glycoprotéique et/ou lipoprotéique. Elles agissent sur 90% des bactéries pathogènes.

La majorité des souches lactiques ont un effet bactériostatique sur la flore pathogène.

Les interactions entre les souches de *Lactococcus* peuvent se réaliser, ainsi que les auto-inhibitions sauf pour la souche Lclj3.

Toutes les bactéries pathogènes ont montré une sensibilité importante à la nisine puisque les zones d'inhibition vont de 9 mm pour *Enterobacter* jusqu'à 18 mm pour *Bacillus cereus* (C).

Mots clés : bactéries lactiques, bactéries pathogènes, *Lactococcus*, inhibition, antagonisme, nisine.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques.....	03
Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques discriminantes pour l'identification de certaines espèces et sous-espèces de Lactocoques.....	04
Tableau 3 : Les bactériocines des bactéries lactiques.....	10

Liste des figures

Figure 01	: Métabolisme du glucose	02
Figure 02	: Aspect microscopique de <i>Lactococcus lactis</i>	05
Figure 03	: Métabolisme du citrate conduisant à la formation du diacétyle.....	06
Figure 04	: Les différentes interactions microbiennes.....	08
Figure 05	: Les différents types des lantibiotiques.....	10
Figure 06	: Mode d'action des bactériocines de classe II	12
Figure 07	: la structure de la nisine.....	13
Figure 08	: Aspect microscopique de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	15
Figure 09	: Aspect microscopique de l'espèce <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
Figure 10	: Aspect microscopique de l'espèce <i>Salmonella enterica typhi</i>	17

Introduction

Les aliments sont une source d'énergie, de nutriments, de vitamines et de minéraux. Cependant ils peuvent aussi être le vecteur de transport pour de nombreux agents pathogènes qui causent des infections chez l'homme.

L'application des technologies modernes de transformation des aliments et des principes de la qualité organoleptique reste insuffisante du fait qu'il y a des toxico-infections alimentaires qui sont à la base de 6.5 à 33 millions de maladies humaines et plus de 9000 morts chaque année dans le monde. L'aliment est donc la source fréquemment mise en cause. (Mead et al ; 1999).

Malgré l'utilisation des différentes techniques de préservation des aliments, les denrées alimentaires sont contaminées par les microorganismes tels que *Listeria monocytogenes* qui est très fréquente dans les produits laitiers.

La demande croissante des consommateurs de pouvoir bénéficier de produit frais prêts à l'emploi avec une innocuité et une durée de conservation maximale tout en ne contenant qu'une quantité minimale de conservateurs chimiques pousse les professionnels de l'agro-alimentaire à se tourner vers des moyens alternatifs de préservation des aliments qui sont des moyens biologique envisagés tels que l'utilisation des bactéries lactiques produisant des bactériocines qui sont des peptides antimicrobiens dont beaucoup ont une action contre *Listeria monocytogenes* (Liu,2003) tel est l'objectif de nos travail.

Objectif de travail

L'interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes dans les aliments est due à plusieurs facteurs :

- ❖ **Les acides organiques** produits par les bactéries lactiques et qui inhibent les bactéries pathogènes.
- ❖ **Les phages** : formés au cours de la fabrication.
- ❖ **Le peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) est formé par les bactéries lactiques et inhibé les bactéries pathogènes.
- ❖ **Les bactériocines** : sont sécrétées par les bactéries lactiques qui ont un rôle bactéricide vis-à-vis des bactéries pathogènes

Ainsi des bactéries lactiques du genre *Lactococcus* de notre collection de laboratoire vont être testées en interaction avec des bactéries pathogènes d'origine hospitalière et alimentaire (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *pseudomonas aerinosa*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*...etc.) afin de pouvoir déduire si nos bactéries lactiques produisent des bactériocines ou non.

Méthodologie de travail

La méthode de travail consiste d'abord à confirmer la morphologie, le type respiratoire et le test de catalase pour les bactéries pathogènes.

Après confirmation on doit d'abord rechercher s'il y a présence ou non des zones d'inhibitions autour des bactéries lactiques en utilisant la méthode de Fleming et al (1975).

Le principe de cette méthode est simple et consiste à ensemencer par touche la flore lactique sur milieu M17, après incubation pendant 24h à 37°C on coule à la surface une gélose molle (semi solide) de la flore pathogènes. Les boîtes de Pétri contenant les deux flores sont incubées pendant 24h à 37°C. S'il y a présence des zones d'inhibition on doit rechercher le facteur responsable de l'inhibition qui peut être :

➤ **Les acides organiques :**

Les bactéries lactiques sont cultivées dans un milieu M17 tamponnée, des cultures témoins sont parallèlement réalisées en milieu non tamponné.

La lecture des résultats consiste à comparer les inhibitions en milieu tamponné et en milieu non tamponné.

➤ **Les phages :**

Pour détecter la présence des phages lysogènes on découpe un fragment de gélose dans la zone d'inhibition qu'on le met dans 1ml de bouillon nutritif, puis 7 µl de ce bouillon est rajouté à 300µl de gélose molle contenant la souche indicatrice ; après incubation s'il y a plage de lyse on réalise un traitement thermique afin d'éliminer les phages ensuite on procède à des interactions avec les bactéries pathogènes, en utilisant la méthode de Fleming et al (1975). S'il y a présence des zones d'inhibition cela veut dire qu'il s'agit d'un autre facteur.

➤ **Le peroxyde d'hydrogène :**

Les bactéries lactiques sont ensemencées par touche après incubation pendant 24h à 37°C, les boîtes sont recouvertes par la gélose molle contenant la souche indicatrice additionnée de l'enzyme catalase, d'autres boîtes de Pétri prise comme témoins ne contiennent pas l'enzyme catalase. La présence ou l'absence des zones d'inhibition est comparé dans les deux types de boîtes.

-S'il y a présence de zones d'inhibition ceci veut dire que le peroxyde d'hydrogène n'est pas le facteur concerné par l'inhibition.

➤ **Les bactériocines :**

On utilise toujours la méthode de Fleming et al (1975) sauf que cette fois ci la gélose molle contient des enzymes protéolytiques (une protéase, la trypsine, la pepsine, et l'alpha chymotrypsine), on réalise parallèlement le même protocole dont la gélose molle ne contient pas d'enzymes protéolytiques.

-Les résultats consistent à comparer les inhibitions en présence et en absence des enzymes protéolytiques.

-S'il y a apparition des zones d'inhibition ceci veut dire qu'il y a une bactériocine qui peut être alors de nature protéique ou lipoprotéique.

La nisine va être aussi étudiée pour son activité inhibitrice vis-à-vis des germes pathogènes testés pour une comparaison avec nos résultats.

Remerciements

C'est grâce à ALLAH le tout puissant que j'ai pu finir ce travail sous la direction de **M^{me} Bendimered .N** Maitre assistante chargée de cours à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen à qui j'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance pour avoir accepté de m'encadrer. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et de déférence.

Je remercie **M^{me} Belarbi .M** Professeur à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen d'avoir présidée le jury de mon travail.

Je remercie **M^{me} Malek .F** Maître assistante chargée de cours à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen d'avoir accepté jugé on travail.

Je remercie **M^r Aribi .M** Maître de conférences .A Professeur à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire.

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

Dédicaces

Au vrai sens de l'amour, je dédie ce modeste travail avec l'aide de Dieu qui ma donner le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Aux être les plus chers du monde :

Mon père et ma mère, en témoignage de mon cœur et de mon profond attachement à leurs soutiens durant mes études.

✚ *A mes sœurs*

✚ *A mon frère*

✚ *A mes amies de la promotion de Biologie Moléculaire et Cellulaire 2008/2009.*

Et à tous ceux qui me sont chers de loin et de près

CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES

I-1 DEFINITION ET ROLE :

Nul besoin d'explication scientifique pour de nombreux peuples qui, depuis des milliers d'années, se servent des bactéries lactique pour produire des aliments. Ils en améliorent ainsi la conservation, et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état original. (Eufic, 2008).

Les bactéries lactiques sont un vaste ensemble de microorganismes procaryotes, ces bactéries regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique à partir des hydrates de carbone. (Labioui et al ; 2005).

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses fermentations alimentaires, elles sont présentes a des niveaux élevés au sein des produits fermentés (de l'ordre de 10⁸ UFC/g dans les fromages, les yaourts, les olives, les saucisses. (Adam, 1999)

I-2 CARACTERES GENERAUX :

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram-positif .Ces bactéries peuvent avoir des formes de bâtonnets ou de coques, sont immobiles et ne sporulent pas .Elles ont également un métabolisme aérobic facultatif et ne produisent pas de catalase .Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique (Sanders, 2001 ; Fooks et Gibson, 2002).

Elles métabolisent les saccharides par deux mécanismes :

- Le processus **homofermentaire**, fermentation des hexoses et du lactose aboutissant en anaérobiose à la production presque exclusive d'acide lactique.
- Le processus **hétérofermentaire**, fermentation des hexoses et du lactose aboutissant à la production d'acide lactique et de substances diverses telles que le gaz carbonique, l'éthanol, le glycérol, des acides en particulier l'acide acétique. (Liebefeld, 2002).

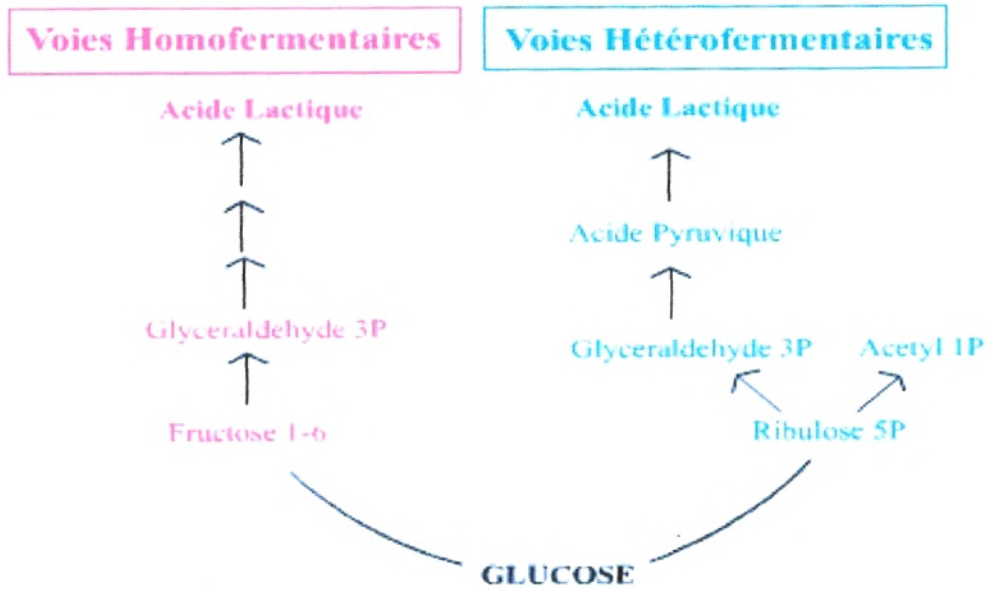


Figure 1 : métabolisme de glucose (Nantes, 1996)
http://www.ac-versailles.fr/tpe/serie-s/yaourt/fermentation_du_lait_2.htm

I-3.HABITAT :

Les bactéries lactiques colonisent des milieux naturels variés tel que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau), on les trouve également dans le lait et les produits laitiers, la viande et le poisson et créent notamment un environnement hostile aux bactéries pathogènes (Badis et al ; 2005).

I-4.CLASSIFICATION :

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et al ; 1997), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer et al ; 2005). Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.

Tableau 1 : Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques

Tableau I : principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques (Axelsson, 1998)

	Carnobacterium	Lactobacillus	Aerococcus	Enterococcus	Lactococcus	Vagococcus	Leuconostoc	Oenococcus	Pediococcus	Streptococcus	Tetragenococcus	Weissella
Formes	Bacille	Bacille	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque
arrangement	Chaines	Chaines	Chaines	Chaines	Chaines	Chaines	Chaines	Chaines	Tétrades	Chaines	Tétrades	Chaines
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	-	+/-	+/-	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO ₂	-	+/-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Production d'acide lactique	L	D.L	L	L	L	L	D	D	D.L	L	L	+/-

nd: non déterminé, +/-: variables selon les espèces.

I-4-1. Les lactocoques :

Les lactocoques sont des bactéries à Gram positif homofermentaires produisant presque exclusivement de l'acide lactique lors de la transformation des hydrates de carbone. Initialement inclus dans le genre *Streptococcus*, ces bactéries sont physiologiquement similaires et parfois même confondues avec les streptocoques fécaux du séro-groupe D. Cependant, les études génétiques ont clairement montré que ces streptocoques acido-lactiques étaient différents. Ils sont depuis 1985, inclus dans le genre *Lactococcus*. Néanmoins et en raison de similitudes importantes entre sous espèces et espèces de lactocoques sont présents dans l'environnement ainsi que dans une grande variété de produits alimentaires comme le lait, le saucisson, le jambon, le cidre, la bière, la choucroute et les cornichons. (Carr et al ; 2002)

I-4-1-1. *Lactococcus* :

Le genre *Lactococcus* est divisé en six espèces (*L. garveiae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. xyloso*), et trois sous-espèces de l'espèce *lactococcus lactis* (*L. lactis lactis*, *L. lactis cremoris*, *L. lactis hordniae*) et un biovar (*L. lactis lactis diacetyactis*) ont été identifiées à ce jour (Carr et al ; 2002). Phénotypiquement similaires, la différenciation entre ces bactéries est d'abord faite sur des critères biochimiques, et notamment, par l'étude de l'utilisation des hydrates de carbone qui permet la distinction entre bactéries homo- et hétérofermentaires. Ainsi, la sous-espèce *lactis*, par rapport à la sous espèce *cremoris* a les particularités de produire de l'ammoniaque à partir de l'arginine, de croître dans une culture à +40 °C, avec 4 % de NaCl, d'utiliser le maltose comme substrat et enfin de ne pas hydrolyser l'hippurate (Facklam et al ; 1995). La distinction entre *diacetylactis* et *lactis* se fait par la production d'acétoïne et de CO₂ à partir du glucose. La sensibilité à la clindamycine et/ou la production d'acide gamma-aminobutyrique qui est absente dans la sous-espèce *cremoris* et présente dans la sous-espèce *lactis*, aident à cette identification. Néanmoins, des similitudes importantes entre sous espèces et espèces, comme entre *L. lactis lactis* et *L. garveiae* rendent cette identification aléatoire (Zlotkin et al ; 1998).

Les études approfondies du génome permettent une distinction précise entre les différentes bactéries, mais leur longueur et leur coût font qu'elles sont peu utilisées, d'autant que la majorité des bactéries n'a d'intérêt que pour l'industrie alimentaire.

La sensibilité aux antibiotiques ne semble pas non plus être très différente d'une espèce à l'autre (Facklam et al ; 1995).

I-4-2. Rôle des lactocoques :

Les souches de *L. lactis* sont utilisées comme base de cultures pour une grande variété de produits laitiers tels le fromage et le yaourt. Elles ont pour intérêt d'amener une production acide correcte et une génération de saveurs et d'arômes. (Saloff et al ; 1994) En fermentant le lait, ces lactocoques donnent au produit fini des caractéristiques organoleptiques particulières (goût, arôme).

Ces caractéristiques sont dues à la production d'acide lactique, à la coagulation des protéines du lait et à la production de divers composés qui sont le résultat du métabolisme des lactocoques et des interactions entre les souches sélectionnées (Rodrigues et al ; 1991). La température, le pH, la présence d'oxygène ainsi que la composition du lait et à travers elle le terroir a également une influence sur la spécificité du produit fini (Basaran et al ; 2001)

Tableau II : Caractéristiques phénotypiques discriminantes pour l'identification de certaines espèces et sous-espèces de lactocoques (Holt et al, 1994 ; Sakala et al, 2002 ; Schleifer et al, 1985 ; Williams et al, 1990).

		<i>Lactococcus</i>						
		<i>piscium</i>	<i>garveiae</i>	<i>plantarum</i>	<i>raffinolactis</i>	<i>lactis</i>		
						<i>cremoris</i>	<i>hordniae</i>	<i>lactis</i>
Fermentation de:								
	Maltose	+	+	+	+	-	-	+
	Raffinose	+	-	-	+	-	-	+
Croissance:								
	à 0°C	+	-	-	-	-	-	-
	à 40°C	-	+	-	-	-	-	+
	avec 4% de NaCl	-	+	+	-	-	-	+
Utilisation de l'arginine								
			+			-	+	+

Combinaisons : + 80% et plus des souches sont positives; - 80% et plus des souches sont négatives.

Handwritten scribbles and illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

I-4-4. *Lactococcus lactis* :

L. lactis est la seule espèce à être utilisée par l'industrie alimentaire. Elle se divise en trois sous espèces : *cremoris*, *hordniae* et *lactis*. Des membres de la sous-espèce *hordniae* ont été isolés à partir d'insectes (Pu et al ; 2002) alors que les deux autres sont très présentes dans l'environnement des fermes laitières et participent à près du tiers des fermentations effectuées dans le monde. Les souches de *L. lactis* sous-espèce *cremoris* dominent les ferments. La différence historique entre les sous-espèces *cremoris* et *lactis* est la capacité des souches de *L. lactis* sous-espèce *lactis* de produire de l'ammoniac à partir de l'arginine. Les sous-espèces *lactis* se divise également en biovar (Sharpe, 1979). Par exemple, *L. lactis* sous-espèce *lactis* biovar *diacetylactis* est utilisée dans la fabrication du babeurre pour la saveur particulière qu'apporte la production du diacétyle lors de l'utilisation du citrate par ces souches.

Lactococcus lactis est soigneusement étudié et mis en de nombreuses applications. Il dispose de plusieurs voies de fermentation mais l'objectif le plus important est sa propriété à la fabrication de produits laitiers comme le fromage et le lait. Les industries continuent à améliorer les activités et l'efficacité de *L. lactis* par la manipulation de son environnement et le comportement des cellules. (Hols et al ; 1999)



Figure 2 : *Lactococcus lactis*

150 x 155 - 43 ko - jpg

www.healthbank.com.hk

I-5. LES CARACTERES BIOINDUSTRIELS DES BACTERIES LACTIQUES :**I-5-1. Pouvoir acidifiant :**

Les bactéries lactiques homofermentaire métabolisent les saccharides en produisant presque uniquement de l'acide lactique ; tandis que les bactéries lactiques hétérofermentaire produisent également d'autres acides tels que l'acide acétique (Labioui et al ; 2005).

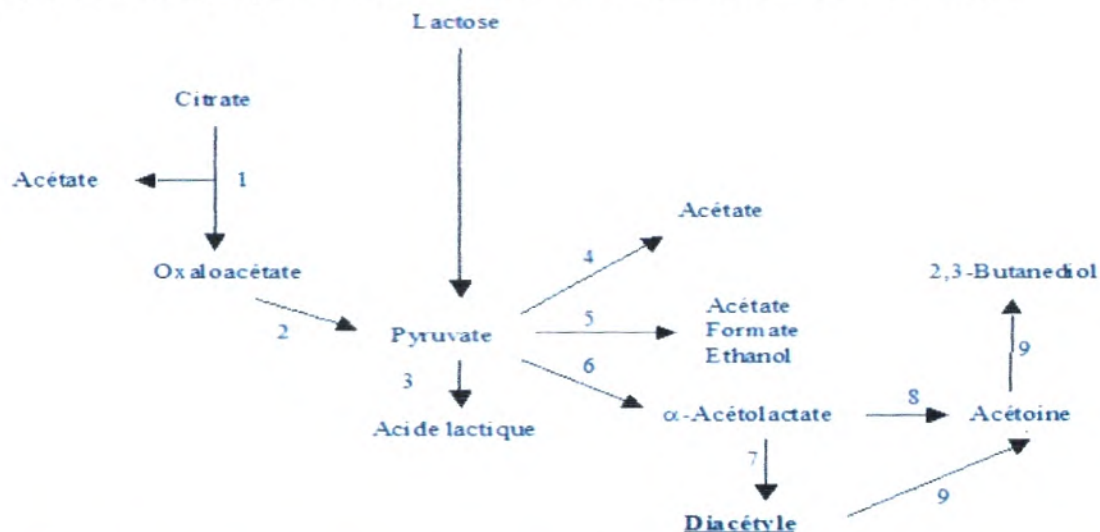
En général la production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables. Des expositions prolongées dans un milieu acide peuvent entraîner la mort de plusieurs bactéries y compris les ferments lactiques (Champomier et al ; 1999). Ainsi les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes. (Jedidi, 2007).

I-5-2. Pouvoir aromatisant :

Le diacétyle (2,3-butanedione) est métabolisé à partir du citrate ou du pyruvate par des bactéries lactiques telles que *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* et des *leuconostoc spp*, ainsi que par quelques *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Il confère aux produits un arôme de beurre. Il possède une activité antimicrobienne qui est plus grande à l'égard de bactéries Gram-négatives, des moisissures et des levures qu'à l'égard des bactéries Gram-positives (Jay, 1981).

I-5-3. Pouvoir gazogène :

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO₂) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment.



Enzymes ou étape : citrate lyase (1); oxaloacétate décarboxylase (2); lactate déshydrogénase (3); pyruvate déshydrogénase (4); pyruvate formate lyase (5); α-acétolactate synthase (6); décarboxylation oxydative (7); α-acétolactate décarboxylase (8); diacétyle-acétoïne réductase (9).

Figure 3 : Métabolisme du citrate conduisant à la formation du diacétyle. Adapté de **Swindell et al. (1996)**.

I-5-3. Pouvoir gazogène :

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO₂) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment.

I-5-4. Pouvoir protéolytique :

Les bactéries lactiques dégradent les protéines et induisent souvent le développement de saveurs lorsque la contamination est massive et la prolifération n'est pas contrôlée. A concentration faible et/ou lorsque le développement est maîtrisé les bactéries protéolytiques contribuent de manière non négligeable à la protéolyse des fromages lors de l'affinage. (**FAO, 1985**).

I-5-5. Production des substances inhibitrices :

La production de substances antibactériennes telles que les bactériocines par des bactéries GRAS (Generally Recognized As Safe) en général et par des bactéries lactiques en particulier représente une voie intéressante pour lutter contre les microorganismes pathogènes et indésirables (**Meghrou, 1993**).

Les bactériocines sont des protéines bactériennes synthétisées par voie ribosomique et exerçant une activité antibactérienne.

Les bactériocines sont des peptides ou protéines produites par des genres bactériens possédant des activités antimicrobiennes habituellement spécifiques et contre les bactéries des espèces apparentées sans être létales à la souche productrice. (**Meghrou, 1993**).

CHAPITRE II : INTERACTION**II-1.Définition**

Il est bien connu que des espèces microbiennes différentes qui coexistent dans un même milieu sont susceptibles d'entretenir des relations. Ces interactions sont généralement classées en interaction positive et interaction négative :

II-2-1.Interaction positive

On parle d'interaction positive lorsqu'il ya production de substances telles que les facteurs de croissance, acides aminés favorisant le développement d'autres organismes. Quand on parle d'interactions positives, on différencie le commensalisme où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur du mutualisme dans ce cas l'interaction est bénéfique aux deux partenaires. (Cholet, 2006)

II-2-2.Interaction négative

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'amensalisme. En revanche si les mécanismes d'inhibition sont réciproques il s'agit alors d'un phénomène de compétition. Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats. (Cholet, 2006)

Ces interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaires et hétérofermentaire des bactéries lactiques. L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène, les bactériocines produites par quelques souches de bactéries lactiques sont également des agents inhibiteurs très puissants (Gilliland, 1985).

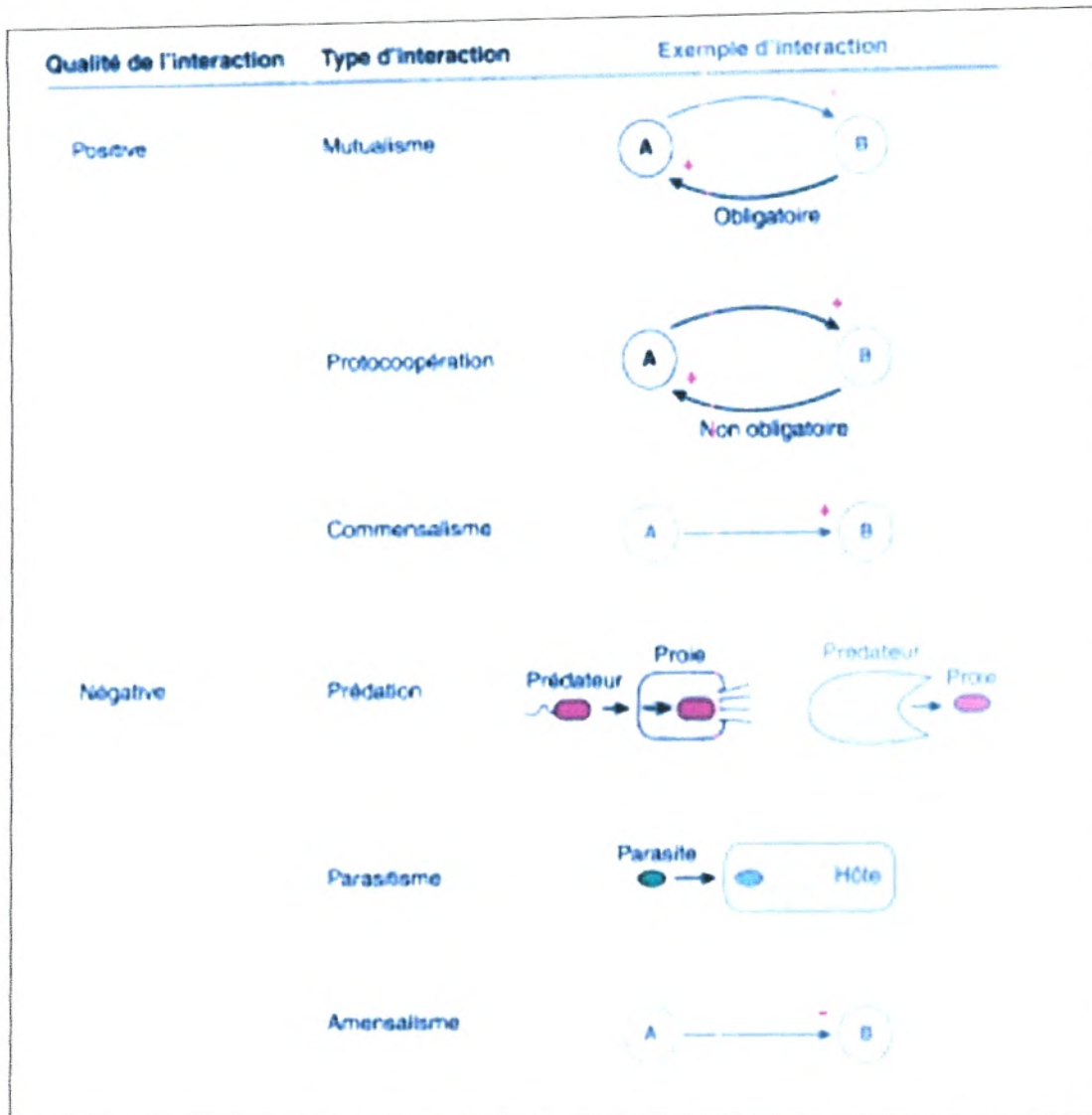


Figure 4 : Les différentes interactions microbiennes.

II-3. production de composés antagonistes par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité d'inhiber dans les aliments le développement de bactéries pathogènes et de détérioration. Cette capacité d'antagonisme est attribuée à la production de métabolites antimicrobiens. On a deux types d'inhibiteurs :

- ❖ Les inhibiteurs non spécifiques comme les acides organiques (acide lactique, acide acétique), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les phages... etc.
- ❖ Les inhibiteurs spécifiques ; tel que les bactériocines (**Beliard, 1990**)

II-3-1. Les inhibiteurs non spécifiques :

⬇ Les acides organiques

Les acides organiques, produits par fermentation dans les aliments, peuvent agir sur la flore par abaissement du p H mais aussi par une action inhibitrice spécifique.

La tolérance des microorganismes vis-à-vis du p H est très variable. la majorité des espèces bactériennes ne peut pas se développer aux p H inférieurs à 4 (**Bourgeois et al ; 1996**).

⬇ Le peroxyde d'hydrogène

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie. En 1951 Wheeler et al mettent en évidence l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus lactis* et l'attribuent en fait au peroxyde d'hydrogène produit par le lactobacille.

Depuis cette date il a été montré que de nombreuses souches de bactéries lactiques peuvent libérer le peroxyde d'hydrogène à des concentrations suffisantes pour provoquer leur auto-inhibition ou inhiber d'autres contaminants de leur environnement (**Bourgeois et al ; 1996**).

✚ Les phages lactiques

Les fermentations industrielles réalisées par les bactéries lactiques sont souvent perturbées par le développement de bactériophages qui vont provoquer un ralentissement ou un arrêt de la production d'acide lactique par suite de la lyse bactérienne. Une collection de bactériophages de différentes espèces de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactococcus lactis ssp cremoris*, *Streptococcus salivarius ssp thermophilus*) a d'abord été constituée à partir de diverses origines. Ces phages ont été caractérisés d'une façon très détaillée, aussi bien sur le plan morphologique que moléculaire.

Cette collection est hautement représentative de l'ensemble des phages que l'on peut rencontrer lors des accidents de fermentation dans les industries laitières. Cette collection de bactériophages bien caractérisés nous a permis d'aborder l'étude des mécanismes de résistance aux bactériophages présents naturellement chez les lactocoques. Des études de lysotypie ont permis d'identifier des souches insensibles à tous les bactériophages : certaines de ces souches sont capables de transférer par conjugaison le caractère de résistance à une souche sensible. Chacun de ces mécanismes a été testé pour sa thermosensibilité et pour la résistance qu'il confère aux différentes familles de phages de *Lactococcus lactis* (**Prevots, 1989**).

II-3-2. Les inhibiteurs spécifiques

II-3-2-1. Les bactériocines

II-3-2-2. Généralités

La détection des bactériocines remonte à 1925 par André Gratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien dont il a donné le nom de colicine V. La colicine V a été caractérisée comme composé peptidique thermostable (**Gratia, 1925**). Tagg et al, (1976) suggéraient qu'un composé antimicrobien ne doit être considéré comme une bactériocine que lorsqu'il satisfait aux critères suivants :

- L'activité des bactériocines doit disparaître sous l'action des protéases.
- Un spectre d'inhibition étroit dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
- La présence d'une fraction protéique biologiquement active.
- Un mode d'action bactéricide.
- Un site d'attachement (récepteurs) spécifique sur les cellules sensibles.
- La bactérie productrice synthétise une molécule qui la protège contre sa propre bactériocine.
- Les bactériocines sont codées par des plasmides.

II-3-2-3. 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**).

II-3-2-4. Classification des bactériocines

Les bactériocines des bactéries lactiques font l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. D'après (**Klaenhammer, 1993**) leur structure primaire a permis de définir une classification en quatre classes :

Classe I :

Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe et al, 2001 ; Twomey et al, 2002). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147.

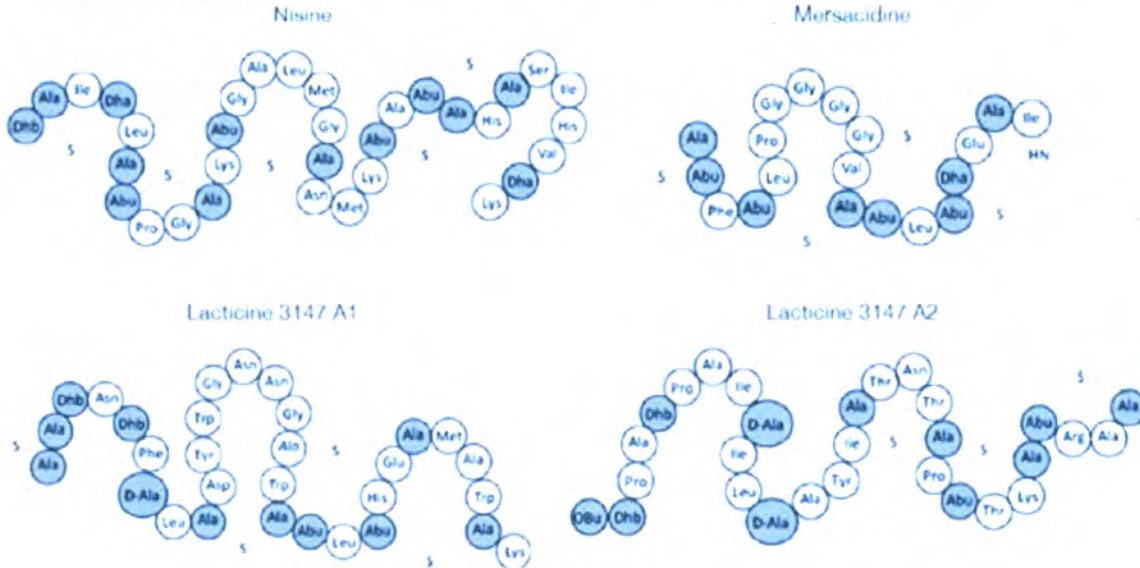


Figure 5 : les différents types des lantibiotiques

Classe II :

La classe II inclut des peptides de taille inférieure à 10 kDa. Ces peptides demeurent également stables après un traitement à la chaleur. Ils ne contiennent pas d'acides aminés modifiés après la traduction. Un site de maturation composé de deux glycines successives est présent dans le précurseur de la bactériocine. Ce groupe comprend deux sous-groupes. Un autre sous-groupe avait été proposé par Klaenhammer (1993), celui des bactériocines thiol-activées. La seule bactériocine thiol-activée alors connue était la lactococcine B.

Classe III :

La classe III comprend des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.

Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysine A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocine A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericine B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen et al, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova, 2007).

Classe IV :

Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

Tableau III : Les bactériocines des bactéries lactiques (Stiles et Hastings, 1991)

Organisme producteur	Bactériocine
<u><i>Lactococcus lactis</i></u> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	Nisine Lactocine 481 Diplococcine Lactostreptins Bactériocine S50
<u><i>Lactobacillus</i></u> <i>L. fermenti</i> 466 <i>L. helveticus</i> 27 <i>L. helveticus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sake</i> Lb 706 <i>L. sake</i> L 45 <i>L. casei</i>	ND Lactocine 27 Helveticine I Lactacine B Lactacine F Plantaricine A Sakaeme A Lactocine S Caseicine 80
<u><i>Pediococcus</i></u> <i>P. acidilactici</i> H <i>P. acidilactici</i> PAC 10 <i>P. pentosaceus</i> FBB61	Pediocine Pediocine PA-I Pediocine A
<u><i>Carnobacterium</i></u>	Substances inhibitrices non dénomées
<u><i>Leuconostoc</i></u> <i>Leu. geldium</i> <i>Leu. mesenteroides</i>	Substances inhibitrices non dénomées Mesenterocine 5

II-3-2-5. Mode d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (**Dortu et Thonart ; 2009**)

La plupart des bactériocines produite par les lactocoques qui ont été caractérisées démontrent un mode d'action semblable. (**Abee et al ; 1995**)

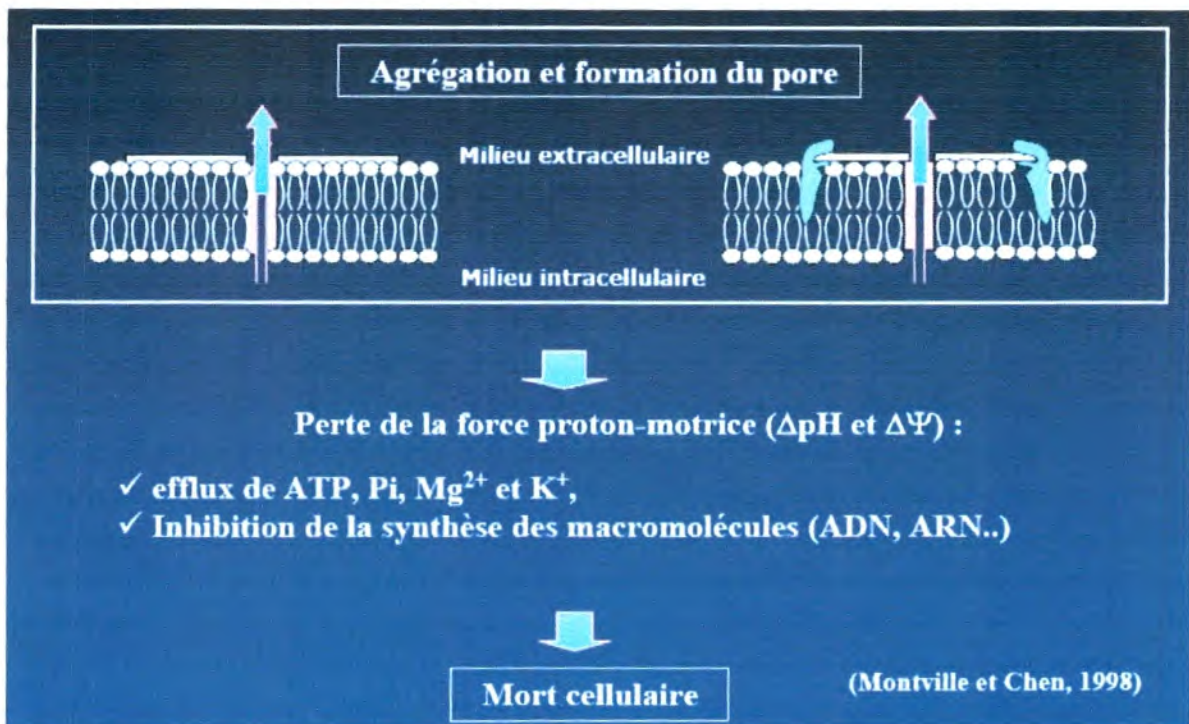


Figure 6 : Mode d'action des bactériocines de classe II

II-3-2-6. Les bactériocines produites par le genre *Lactococcus*

- ❖ **Lacticine 481** : découverte par (Piard et al ; 1990) et produite par la souche de *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Cette bactériocine constituée de 27 résidus d'acides aminés, est un antibiotique de poids moléculaire 2,9kDa.
- ❖ **Lacticine 3147** : produite par la souche de *Lactococcus lactis subsp. lactis* a un large spectre d'action et nuit pas à l'acidification du lait de fromagerie par les ferments, tout en limitant la croissance des autres bactéries (Ryan et al ; 1996)
- ❖ **Diplococcine 346** : elle est produite par la souche 346 de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Son poids moléculaire est de 5.3kDa et elle comprend 51 résidus d'acides aminés. Ce n'est pas un antibiotique (Davey, 1981)
- ❖ **Lactococcine** : forment une famille de bactériocines produites par différentes souches de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (Nissen et al ; 1992)
- ❖ **Lactostrepcine** : est un ensemble de cinq bactériocines, les lactostrepcines 1,2,3,4 produites par *Lactococcus lactis subsp. lactis* et la lactostrepcine 5 produite par *Lactococcus lactis subsp. cremoris 202* (Kozac et al ; 1977)

II-3-2-6. La Nisine :

La nisine appartient à la classe I des bactériocines (Klaenhammer, 1993). Cette classe regroupe les composés protéiques d'une taille inférieure à 5 kDa et contenant les acides aminés modifiés thioéther lanthionine et méthyllanthionine et des acides aminés déshydratés tels que le didéshydrobutyrine (Dhb) et didéshydroalanine (Dha). Le terme antibiotique (par contraction des mots lanthionine et antibiotique) leur est généralement réservé (Sahl et al ; 1998).

La nisine est un peptide de 3488 Da constitué de 34 acides aminés. Les molécules de nisine peuvent s'assembler en dimères ou oligomères de 7000 à 14000 Da (Klaenhammer, 1993). La conformation en anneaux des lanthionines assurerait la rigidité du peptide, diminuerait sa sensibilité à la protéolyse et augmenterait sa résistance à la chaleur (Mc Auliffe et al ; 2001).

La nisine est un agent antimicrobien produit par quelques souches de *Lc. lactis* sp. La nisine fut découverte en 1928 par Rogers lorsqu'il s'aperçut qu'un métabolite est produit par *Streptococcus lactis* (*Lc. lactis* dans la nouvelle nomenclature).

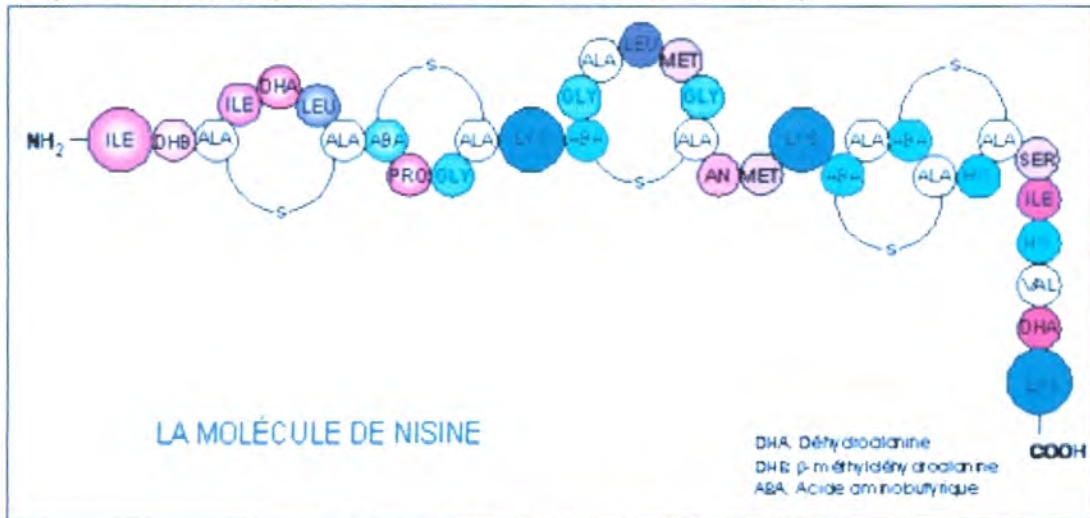


Figure 7 : la molécule de la nisine

<http://members.aol.com/moraroht/cv/soucrest.htm>

➤ Utilisation des bactériocines en industrie alimentaire

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines, leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire (Delves-Broughton, 1990). L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires. Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée (Jedidi, 2007), les produits à base d'oeufs liquides pasteurisés, les fromages et d'autres produits laitiers. En effet, la nisine est la plus étudiée des bactériocines et la seule utilisée commercialement dans les produits alimentaires. Elle a été commercialisée pour la première fois comme conservateur alimentaire en Grande Bretagne il y a plus de 30 ans. Son utilisation a été tout d'abord établie comme préservateur dans les produits de fromage fondus, et depuis de nombreux d'autres applications alimentaires ont été rapportés (Delves-Broughton, 1996). En Europe, des recherches ont démontré le potentiel de la nisine à contrôler la détérioration de la bière et du vin par les bactéries lactiques (Radier, 1990). D'autres études récentes ont exploités les bactériocines des bactéries lactiques comme bio-ingrédients antimicrobiens naturels pour la conservation à long terme de produits marins prêts à consommer. Ces chercheurs ont démontré que l'utilisation de la souche *Carnobacterium divergens* ou de sa bactériocine, la divergicine M35, a permis de contrôler la croissance de *Listeria monocytogenes* et de *Clostridium botulinum* pendant 21 jours d'entreposage à 4°C. De même aucun effet négatif n'a été observé au niveau des caractéristiques organoleptiques et sensorielles du saumon fumé traité. D'autres études ont montré l'utilisation des bactériocines comme agent antimicrobien dans l'emballage des produits carnés (Ming et al ; 1997). Des sacs enduits de pédiocine ont permis d'inhiber complètement la croissance de *Listeria monocytogenes* inoculés dans divers produits carnés conservés pendant douze semaines à 4°C.

Afin de s'assurer de l'efficacité des bactériocines utilisées pour des applications alimentaires en tant que préservateurs, un conservateur alimentaire doit avoir les propriétés suivantes :

- Etre actif sur les micro-organismes pathogènes aussi bien que sur ceux responsables des altérations des aliments.
- Etre inoffensif pour les humains ou les animaux.
- Etre stable et non détruit au contact de l'aliment ou du micro-organisme.

- Etre rapidement soluble et distribué uniformément dans l'aliment.
- Ne pas être inactivé par l'aliment, ni conférer de saveur ou d'arôme à l'aliment.
- Etre économique.
- Ne pas favoriser l'apparition de micro-organismes résistants.
- Ne pas diminuer la valeur nutritive de l'aliment.

D'une façon générale, les conservateurs alimentaires entre autre les bactériocines inhibent les micro-organismes en interférant avec leur membrane cellulaire, leur activité enzymatique ou leur métabolisme génétique. Ainsi, ils peuvent dénaturer leur protéine, altérer ou détruire leur ADN, leur paroi cellulaire ou leur membrane cytoplasmique. Ainsi, par ces divers mécanismes d'action, ces additifs naturels peuvent améliorer largement la sécurité alimentaire des produits. (**Jedidi, 2007**)

CHAPITRE III : LES BACTERIES MESOPHILES

III-1. Généralités

Les bactéries pathogènes sont les bactéries susceptibles d'entraîner des maladies, les TIA (toxi infection alimentaires), ou intoxications, qui apparaissent lorsque ces bactéries produisent des toxines : botulisme. Les MIA (maladies infection alimentaires) qui sont dues au développement des bactéries dans l'organisme, après ingestion d'un aliment contaminé : gastro-entérites, listérioses, fièvres typhoïdes, brucellose... .

La plupart des aliments contiennent toujours une certaine quantité de germes qui restent bénins tant qu'ils ne se développent pas de façon importante. (Thierry, 2008)

Parmi les germes pathogènes éventuellement rencontrés dans les aliments, on peut citer :

Escherichia coli , *Listeria monocytogenes* , *staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *klebsciella* , *salmonella* , *Enterobacter*.

III-1-1. *Escherichia coli*:

Figure 8 : *Escherichia coli*

480 x 360 - 38 ko - jpg

www.socialfiction.org

Escherichia coli est un genre bactérien dans lequel on ne retrouve qu'une seule espèce ; mais il existe plus de 1.000 types antigéniques. Ces sérotypes sont définis selon leurs antigènes somatiques O (171), capsulaires K (80) et flagellaires H (56). De plus, K sont subdivisés en types A, B ou L. Le type B est rencontré exclusivement dans les souches associées aux diarrhées infantiles.

Assez court (2 à 3 μm x 0.7 μm), isolé, groupé par 2 ou plus rarement en amas. *Escherichia* peuvent apparaître sous forme coccobacillaire ou filamenteuses dans les vieilles cultures. Mobilité, péritriche très réduite, voire immobiles (ex sérotype O111) parfois capsulés (antigène A). Sa culture est très facile avec une grande tolérance de variation du pH, pH optimum 7.5. La température optimum est de 37°C mais pousse entre 15°C et 45°C. Il résiste bien à la chaleur : incubé à 45°C il fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz. Il reste relativement sensible aux antibiotiques. Il réduit les nitrates en nitrites. Il fermente irrégulièrement le saccharose et la salicine. Il dégrade le tryptophane en indole. La plupart possèdent une lysine décarboxylase (Peiffer, 2008).

III-1-2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif, mobile à 22°C (péritriche), immobile à 37°C, non capsulé, non sporulé, mesurant 1-4 μm / 0,5 μm , en chaînes courtes ou petits amas. Les bactéries cultivent facilement sur milieux ordinaires entre 4°C et 45°C (optimum 30-37°C) et donnent des colonies de 1-2mm, transparentes, à bords réguliers, irisées, β - hémolytiques sur gélose au sang (cheval 5%). Ces colonies sont catalase + et produisent une lécithinase. C'est une bactérie aéro-anaérobie, fermentant le glucose et l'esculine sans gaz. Les caractères fermentaires des sucres permettent de distinguer les espèces du genre *Listeria*. (Berche, 2002).

III-3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie de la famille des Micrococcaceae de forme sphérique (coque), de 0,8 µm à 1,0 µm de diamètre. Ces coques à Gram+ se présentent généralement en grappe, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, asporulée et aérobie facultatif possédant une catalase.

S. aureus est un microorganisme pathogène dont on connaît au moins deux types de manifestations cliniques chez l'homme. Les staphylocoques sont d'abord souvent mis en cause dans les cas de toxi-infections alimentaires où il y a production d'une entérotoxine thermorésistante responsable de gastro-entérites. Ils sont également responsables d'infections rhinopharyngées et cutanée qui sont de loin prédominantes par rapport aux infections gastro-intestinales (Québec, 2000).

III-4. *Pseudomonas aeruginosa*

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires), non sporulés, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, nitrate réductase positive et respirant les nitrates, catalase et oxydase positives. *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'utiliser des sucres comme source de carbone et d'énergie en produisant de faibles quantités d'acides. Cette acidification résulte toujours d'un métabolisme oxydatif, elle est toujours faible et elle ne s'observe que lorsque les conditions d'oxygénation sont bonnes. (Euzéby, 2005)

III-5. *Klebsiella* :

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif, de 0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 0,6 à 6,0 µm de longueur, se présentant de manière isolée, ou en groupés par deux ou groupés en courtes chaînes et présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, ODC négative, ADH négative, tryptophane désaminase et phénylalanine désaminase négatives, bêta-glucuronidase négative, n'hydrolysant ni l'ADN ni le Tween 80, ne produisant pas d'hydrogène sulfuré et fermentant de nombreux sucres dont l'inositol. (Grimont, 1999).

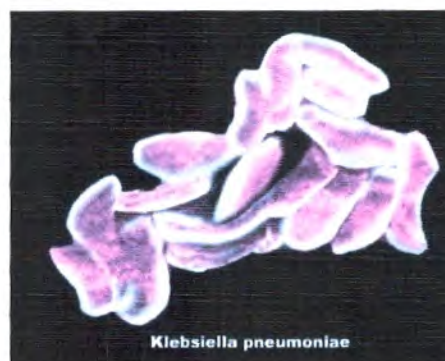


Figure 9: *Klebsiella pneumoniae*
535 x 423 - 25 ko - jpg –
www.vulgaris-medical.com

III-6. *Salmonella* :

Le genre *Salmonella* est l'un des plus importants de cette famille. Il comprend des bactéries asporulées, gram négatifs, généralement mobiles grâce à des cils péritriches, parfois immobiles (*S. pullorum*, *S. gallinarum*). Sur la base des caractéristiques, le genre *salmonella* est subdivisé en

4 sous-genre :

- **Sous genre I** : Il est le plus important car il contient la majorité des espèces pathogènes pour l'homme et l'animal.
- **Sous genre II** : Il contient des sérotypes communément trouvés chez les reptiles et rarement chez l'homme.
- **Sous genre III** : Il contient le groupe Arizona.
- **Sous genre IV** : Il contient les sérotypes rares de salmonella.

Les salmonelles sont des organismes mésophiles, distribués dans le monde entier. La température optimale de croissance est 37°C.

Elles sont présentes chez l'homme au niveau des intestins, mais aussi chez les mammifères, les oiseaux et bon nombre d'animaux à sang chaud (**Brisou et al ; 1978**).

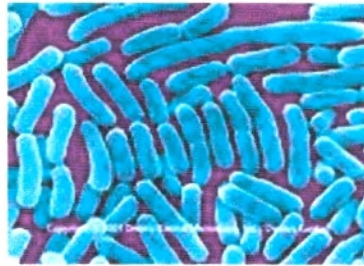


Figure 10: *Salmonella enterica typhi*
500 x 400 - 35 ko - jpg
web.uconn.edu

III-7. Enterobacter

Les entérobactéries du genre *Enterobacter* sont des bacilles à Gram négative, oxydase positive, possèdent l'enzyme bêta galactosidase, produisent l'acétoïne. On reconnaît actuellement 13 espèces, dont neuf ont été isolées chez l'homme. *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter cloacae* sont les plus communes, responsables essentiellement d'infections nosocomiales. Les bactéries du genre *Enterobacter spp* sont des bactéries retrouvées dans l'environnement et dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Elles sont responsables essentiellement d'infections nosocomiales surtout chez les patients présentant une immunodépression : infection urinaire, pneumopathie, bactériémies, le plus souvent associées à des infections sur cathéters, à des infections chirurgicales. Elles deviennent actuellement des pathogènes majeurs dans cette situation. (**O'Hara, 1989**)

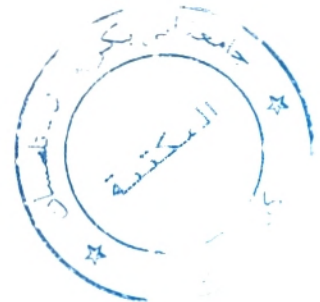
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * **Abee T, Rombouts FM, Hugenholtz J, Guihard G, Letellier L.1994.** Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 60: 1962-1968.
- * **Adams M.R.1999.** Safety of industrial lactic acid bacteria .*J.Biotechnol.*68 (2-3):171-8
- * **Axelsson.L, 1998.**Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects.*70 (2-4):347-58
- * **Badis. A, Laouabdia-Sellami. N, Guetarni.D, Kiha.M, OUZROUT.R.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à Partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie C – N°23*, juin (2005), pp. 30-37.
- * **Basaran P, Basaran N, Cakir I.2001.** Molecular differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris* strains by ribotyping and site specific-PCR. *Curr Microbiol.*42:45–8.
- * **Beliard. E, 1990.** Sélection de souches de bactéries lactiques inhibitrices de contaminants des viandes et étude des mécanismes d'inhibition. Disponible sur : <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=195371>.
- * **Berche.P.2002.** LISTERIA MONOCYTOGENES.Disponible sur le site : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/listeriam.html>
- * **Bourgeois.C,Larpent.J.P, 1996.** Microbiologie alimentaire .Tome 2 ; aliments fermentés et fermentation alimentaires.Ed.Tec et Doc,Lavoisier.
- * **Brisou JF, Denis FF.** Hygiène de l'environnement maritime. In collection de biologie des milieux marins, 1978. Massou, Paris, New York, Barcelone, Milan. 218 pp.
- * **Carr FJ, Chill D, and Maida N, 2002:** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol.*28 : 281-370.
- * **Champomier Verges.M.C,Zuniga.M,Morel.F.D,Perez.M.G,Zagorez et Ehrlich.1999.** Relationships between arginine degradation,ph and survival in *Lactobacillus sakei*.*FEMS Microbiol.Lett.*180(2):297-304
- * **Cholet.O.2006.**Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire .Mémoire de doctorat en microbiologie.Institut de Paris-GRIGNON.
- * **Davey .G.P.**Mode of action of diplococcin , a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346,NZ Journal Dairy Sci.Technol ; 1981,16,187-190
- * **Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R J. et Hugenholtz, J. (1996),** Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(2): 193-202.

- ***Dortu .C, Thonart.P.2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154.
- * **Eufic, 2008.** Intérêt des Bactéries Lactiques en Alimentation. Le Conseil Européen de l'Information Alimentaire. Disponible sur :
<http://www.caducee.net/Fiches-techniques/EUFIC/bacteries-lactiques.asp>
- ***Euzéby .J.P. 2005.** Pseudomonas. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.Disponible sur le site : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/pseudomonas.html>. 2005.
- ***Facklam RR, Elliott JA.** Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the Streptococci and Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1995;4:479-95.
- * **FAO, 1985.** La matière première –lait. La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen. ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE .Rome. M-26. ISBN 92-5-202169-8.
- ***Fooks. L.j. Gibson.G.R, 2002.** Probiotics as modulators of. The gut flora .*Brit.J. Nutr* ;88,suppl.1:39-49.
- * **Gilliland .S.E.1985.** Role of starter culture bacteria in food preservation. In : Bacterial starter cultures for foods, pages 175-185. Ed. Gilliland SE, CRC Press, Inc. Boca Raton USA.
- * **Gratia, 1925.** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre souches de colibacilles.*Conseil Royal Société Biologie* 93 : 1040- 1041.
- ***Grimont.F, Grimont.P.D.A, Richard.C:** The genus *Klebsiella*. In : M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release Release 3.0, 5/21/1999, Springer-Verlag, New York
- * **Hols, P., Kleerebezem, M., Schanck, A., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J., and de Vos, W.M.** Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering". *Nature Biotechnology*. 1999. Volume 17. p. 588-592.
- * **Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley et S. T. Williams. 1994.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9eme édition, The Williams Wilkins Co, Baltimore, États-Unis.
- * **Jay. H. J.** Antimicrobial properties of diacetyl, *Appl .Environ.Microbiol*; 1981, 44,525-532.
- * **Jedidi.H. 2007.** Effet de stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en microbiologie agricole.
- ***Klaenhammer T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.

- * **Klaenhammer T.R, 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3), 39-85.
- * **Klaenhammer T.R, Barrangou R, Logan Buck B, Azcarate-Peril M.A, 2005.** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 393-409.
- * **Kozak W, Bardowski J, Dobrzanski WT.** Lactostrepcin-A bacteriocin produced by *streptococcus lactis*, *Bull. Acad. Polon. Sci* ; 1977, 25, 217-221
- * **Labioui.H, Laaroussi .E, Yachioui .M, Ouhssine. M.** Sélection de souche de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005, 144, 237-250.
- * **Liebefeld, 2002.** Microbiologie des cultures . Disponible sur le site : www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_HniJP_2002_16039.pdf
- * **Liu.2003.** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int.J.Food Microbiol.* 83 (2), 115-131.
- * **McAuliffe O, Hill C, 2001.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 285-308.
- * **Mead.P.S, Slutsker.L, Dietz.V, Mccaig.L, Bresee.J, Griffith.P, Tauxe.R(1999).** Food related in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.
- * **Meghrous.D, 1993.** Isolement, caractérisation et purification de bacteriocines produites par des bacteries lactiques : études physiologiques et biochimiques. Disponible sur : <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=158521>.
- * **Ming.X, Xeber.G.H, Ayres.J.W, Sandine.W.E.** Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats , *J.Food Sci* ; 1997, 62, 2, 413-415 .
- * **Nantes, 1996.** La fermentation du lait. Disponible sur le site : http://www.ac-versailles.fr/tpe/serie-s/yaourt/fermentation_du_lait_2.htm
- * **Nigutova K.2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enIA homologues among ruminal Gram⁺ cocci. *J. Appl. Microbiol.*, 102(2), 563-569.
- * **Nilsen T., Nes I.F, Holo H., 2003.** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5), 2975-2984.
- * **Nissen-Meyer .J, Holo.H, Havarstein LS, Sletten K, Nes I.F.** A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides , *J.Bacteriol* ; 1992, 174, 5686-5692
- * **O'Hara.C.M, Steigerwalt.A.G, Hill.B.C, Farmer.J.J, Fanning.G.R , Brenner.D.J.** *Clin. Microbiol*, 27, 2046-2049(1989)
- * **Papagianni M. 2003.** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21(6), 465-499.

- * **Stiles M.E., Holzapfel W, 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36(1), 1-29.
- * **Stiles .M.E., Hasting. J.W.** Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation, *Trends Food Sci. Technol.*, 1991, 2, 10, 247-251.
- * **Swindell SR, Benson KH, Griffin HG, Renault P, Erlich SD, Gasson MJ, (1996).** Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2641-2643.
- * **Thierry L, 2008.** Alimentaire – Pro. Le portail des TPE et PME de la filière agroalimentaire. Disponible sur :
http://www.alimentaire-pro.com/dossiers/microbiologie_aliments.php
- * **Twomey D, Ryan M, Meaney B, Hill C, 2002.** Antibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 165-185.
- * **Williams, A. M., J. L. Fryer et M. D. Collins.** 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:109-113.
- * **Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H.** Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:983–5.



Liste des tableaux

Tableau 1 : Bactéries utilisées et leurs origines	4
Tableau 2 : Caractéristiques des bactéries pathogènes.....	14
Tableau 3 : Zones d'inhibitions (en mm) formées par la production d'acide.....	17
Tableau 4 : Effet bactériostatique ou bactéricide des bactéries pathogènes.....	26
Tableau 5 : Zones d'inhibitions formées (en mm) entre les souches lactiques.....	27
Tableau 6 : Les zones d'inhibition formées en (mm).....	28

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentatif de la méthode de Fleming et al.,(1975).....	6
Figure 2 : Recherche des plages lysogènes.....	8
Figure 3 : détection des inhibitions par les bactériocines.....	10
Figure 4 : détection de l'effet bactériostatique et l'effet bactéricide.....	12
Figure 5 : Observation microscopique après coloration des bactéries pathogènes.....	15
Figure 6 : Observation du type respiratoire des bactéries pathogènes.....	15
Figure 7 : Confirmation du test de catalase.....	15
Figure 8 : Détermination des inhibitions par les bactéries lactiques à l'égard des bactéries pathogènes.....	16
Figure 9 : Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lclj3.....	18
Figure 10 : Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lclj4.....	19
Figure 11 : Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lcdj1.....	19
Figure 12 : Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lcdj2.....	20
Figure 13 : Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lcdj3.....	20
Figure 14 : Zones d'inhibitions formées par le peroxyde d'hydrogène.....	21
Figure 15 : Inhibition due aux bactériocines de Lclj3.....	22
Figure 16 : Inhibition due aux bactériocines de Lclj4.....	23
Figure 17 : Inhibition due aux bactériocines de Lcdj1.....	23
Figure 18 : Inhibition due aux bactériocines de Lcdj2.....	24
Figure 19 : Inhibition due aux bactériocines de Lcdj3.....	24
Figure 20 : Zones d'inhibitions formées par les bactériocines.....	25
Figure 21 : Effet bactéricide et bactériostatique des souches lactiques.....	26
Figure 22 : Interactions entre les bactéries lactiques.....	27

Figure 23 : Effet de la nisine sur les bactéries pathogènes (méthode des disques et des puits).....28

introduction

Depuis toujours les bactéries sont présentes dans notre alimentation certaine d'entre elles dont les bactéries lactiques sont utiles d'autres comme les bactéries pathogènes ne le sont pas. Ces dernières sont très nombreuses. Elles posent beaucoup de problèmes car en plus de causer diverses maladies elles peuvent altérer et dégrader la nourriture.

La préservation de l'innocuité alimentaire constitue donc un combat constant contre ces micro-organismes. Malgré l'utilisation des différentes techniques de préservation des aliments, les denrées alimentaires sont contaminées par les microorganismes tels que *Listeria monocytogenes* qui est très fréquente dans les produits laitiers (Cintas et al, 1998).

La demande croissante des consommateurs de pouvoir bénéficier de produit frais prêts à l'emploi avec une innocuité et une durée de conservation maximale tout en ne contenant qu'une quantité minimale de conservateurs chimiques pousse les professionnels de l'agro-alimentaire à se tourner vers des moyens alternatifs de préservation des aliments qui sont des moyens biologique envisagés tels que l'utilisation des bactéries lactiques produisant des bactériocines qui sont des peptides antimicrobiens dont beaucoup ont une action contre *Listeria monocytogenes* (Liu,2003).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme agent protecteur dans les aliments fermentés. Ces bactéries sont présentes dans une grande variété d'aliments, tels les yaourts, les saucisses fermentées et les fromages. Ainsi, différentes souches d'intérêt commerciale ou scientifique y sont couramment isolées (Rodriguez et al., 1995; Cardinal et al., 1997).

Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité d'inhiber dans les aliments le développement de bactéries pathogènes et de détérioration .cette capacité d'antagonisme est attribuée à la production de deux types de métabolites antimicrobiens :

Les inhibiteurs non spécifiques comme les acides organiques (acide lactique, acide acétique... etc.), le peroxyde d'hydrogène et des inhibiteurs spécifiques tels que les bactériocines.

Les acides organiques, produits par fermentation dans les aliments, peuvent agir sur la flore par abaissement du p H mais aussi par une action inhibitrice spécifique.

La tolérance des microorganismes vis-à-vis du p H est très variable. la majorité des espèces bactériennes ne peut pas se développer aux p H inférieurs à 4 (Bourgeois et al ; 1996).

De nombreuses souches de bactéries lactiques peuvent libérer le peroxyde d'hydrogène à des concentrations suffisantes pour provoquer leur auto-inhibition ou inhiber d'autres contaminants de leur environnement (**Bourgeois et al ; 1996**).

Les fermentations lactiques peuvent être gravement perturbées par des virus parasites des bactéries (phages). Ces virus pénètrent dans les cellules, s'y multiplient et provoquent finalement leur lyse ; les phages libérés vont alors infester de nouvelles bactéries. Ces phages lytiques se répliquent rapidement et envahissent les ateliers de fabrication ou de préparation des levains. A côté de ces phages virulents, il existe des phages dits tempérés pénètrent dans la cellule bactérienne, s'y multiplient mais ne deviennent lytiques qu'après un certain délai sous l'influence de facteurs extérieurs (**Prevots, 1989**).

Les bactériocines des bactéries lactiques font l'objet d'une attention toute particulière en raison d'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. D'après (**Klaenhammer, 1993**) leur structure primaire a permis de définir une classification en quatre classes (les lactonocyclines, classe II, classe III et classe IV). Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire. Cependant les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (**Dortu et Thonart ; 2009**). La seule bactériocine autorisée en industrie alimentaire est la nisine (peptide de 3488 Da constitué de 34 acides aminés) du fait qu'elle agit sur les bactéries nuisibles et les facteurs de détérioration. La nisine est un peptide antimicrobien naturel produit par des souches de *Lactococcus lactis subsp. lactis* qui inhibe efficacement les bactéries Gram-positives et Gram-négatives et aussi les spores de *Bacillus* et de *Clostridium*.

En outre il a été utilisé comme un bioconservateur et un agent potentiel dans les produits pharmaceutiques vétérinaires et les soins de santé (De Arauz et al., 2009).

Dans notre travail on s'intéresse au genre *Lactococcus* et son mode d'action sur les bactéries pathogènes, pour cela on a structuré cette étude de la façon suivante :

- La première partie consiste d'abord à chercher l'effet antagoniste de cinq souches lactiques du genre *Lactococcus* isolé de lait de jument vis-à-vis de neuf bactéries pathogènes en utilisant la méthode de Fleming et al., (1975).

➤ La deuxième partie consiste à rechercher la nature de ces inhibiteurs qui peuvent être un acide, le peroxyde d'hydrogène, des phages ou alors des bactériocines en recherchant si l'effet de ces facteurs est bactéricide ou bactériostatique.

Dans la dernière partie nous avons réalisés des interactions entre les bactéries lactiques et des auto-inhibitions, puis on a recherché l'action de la nisine sur les bactéries pathogènes.

I. Bactéries utilisées :

Nous avons travaillé avec 5 souches lactiques du genre *Lactococcus* et 9 bactéries pathogènes, regroupées dans le tableau suivant :

Tableau01 : Bactéries utilisées et leurs origines

Bactéries		Origine
Code	Lactiques	Proviennent de la collection de notre laboratoire de microbiologie
Lclj3	Lactococcus lactis 3 de jument	
Lclj4	Lactococcus lactis 4 de jument	
Lcdj1	Lactococcus diacetylactis 1 de jument	
Lcdj2	Lactococcus diacetylactis 2 de jument	
Lcdj3	Lactococcus diacetylactis 3 de jument	
	Pathogènes	
	E.coli Klebsiella Salmonella	Hospitalière
	Pseudomonas Listeria Staphylocoque Enterobacter	Alimentaire du centre vétérinaire de Tlemcen
<i>Bacillus cereus</i> (R)	<i>Bacillus cereus</i> de référence : ATCC11778	Laboratoire de microbiologie de l'université de Tlemcen
<i>Bacillus cereus</i> (C)	<i>Bacillus cereus</i> de collection	

I.1 – Préparation des souches :

I.1.1 – Bactéries lactiques :

Les souches lactiques étaient conservées dans du glycérol à -20°C, après décongélation elles sont revivifiées dans le milieu MRS liquide puis incubées pendant 48h à 30°C.

I.1.2 – Bactéries pathogènes :

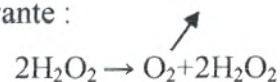
Les bactéries pathogènes étaient conservées au réfrigérateur dans des tubes inclinés, elles sont revivifiées dans un bouillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

I.2 – Confirmation de quelques caractères phénotypiques des bactéries pathogènes :

On a effectué des ensemencements de bactéries pathogènes sur différentes géloses en boîtes de Pétri puis étudié les tests suivants :

- Coloration de Gram et observation microscopique afin d'identifier la forme et la disposition des bactéries.
- Type respiratoire est recherché en ensemençant les bactéries dans des tubes contenant le milieu VF.
- Test de catalase :

L'enzyme catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (H₂O₂) selon la formule suivante :



II. Détection de l'antagonisme :

Pour mettre en évidence l'effet inhibiteur qu'exercent les bactéries lactiques sur les germes pathogènes on utilise les méthodes suivantes :

II.1 – Méthode de Fleming et al., (1975) :

Cette méthode consiste à ensemenser par touche les souches de *Lactococcus sp* à la surface du milieu MRS solide, on laisse sécher pendant quelques minutes à une température ambiante puis les boîtes sont mises à l'étuve pendant 24h à 30°C. Après incubation on coule à la surface de la boîte 7ml de gélose nutritive molle contenant 500µl d'une culture pathogène prise d'un bouillon nutritif de 24h. On laisse le milieu se solidifier puis on incube à 37°C pendant 24h.

L'inhibition se traduit par l'apparition d'une zone transparente autour des souches lactiques ensemençées par touche.

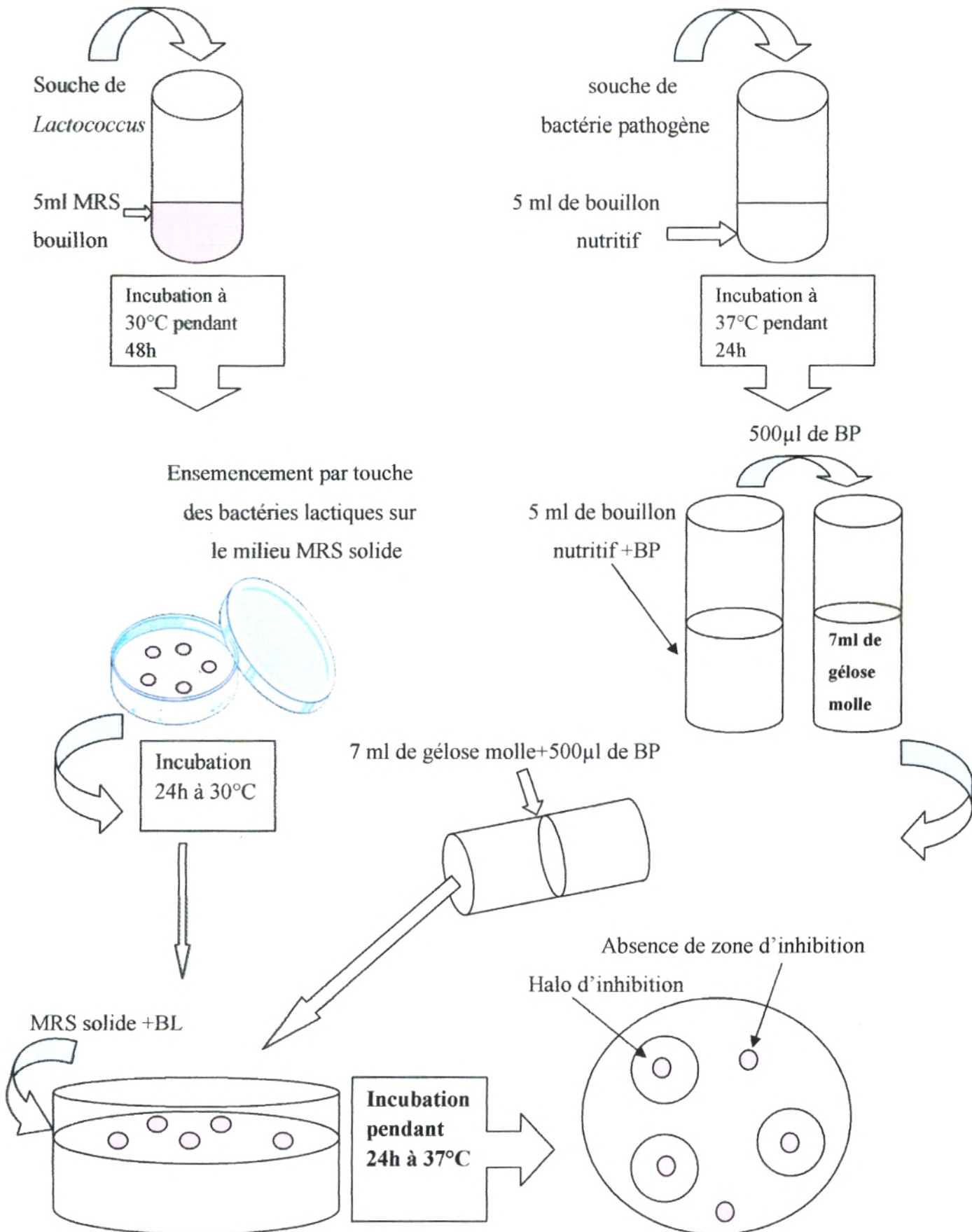


Figure 01 : Schéma représentatif de la méthode de Fleming et al.,(1975)

III – Détermination de la nature d'inhibition :

Les bactéries lactiques de genre *Lactococcus* sont caractérisées par la production de certains métabolites qui leur sont propres pour inhiber le développement des flores d'altération ou pathogènes. Parmi eux les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les phages ou les bactériocines.

Dans ce contexte nous avons été amenés à vérifier la production de tous ces facteurs afin de déterminer la nature d'inhibition.

III.1 – Inhibition due à l'acidité:

Les bactéries lactiques sont marquées par la production d'acide organique au cours de leur multiplication ce qui implique la diminution du pH intracellulaire et extracellulaire qui limite aussi la croissance des bactéries indésirables (Gilliland, 1985).

Les souches lactiques sont cultivées dans un milieu MRS tamponné à pH =7 et contenant 0.25% du glucose afin de diminuer le taux d'acidité créée par la culture lactique.

Des cultures témoins sont parallèlement testées en milieu non tamponné.

Le milieu tamponné est préparé comme suit :

- **Solution A** : (phosphate mono sodique) 27,8g de $\text{Na H}_2 \text{PO}_4$, dans 1000ml d'eau distillée
- **Solution B** : (phosphate disodique) 53,65g de Na_2HPO_4 dans 1000ml d'eau distillée.

Pour préparer 1 litre de milieu MRS tamponné, on prend 165 ml de la solution A et 305 ml de la solution B.

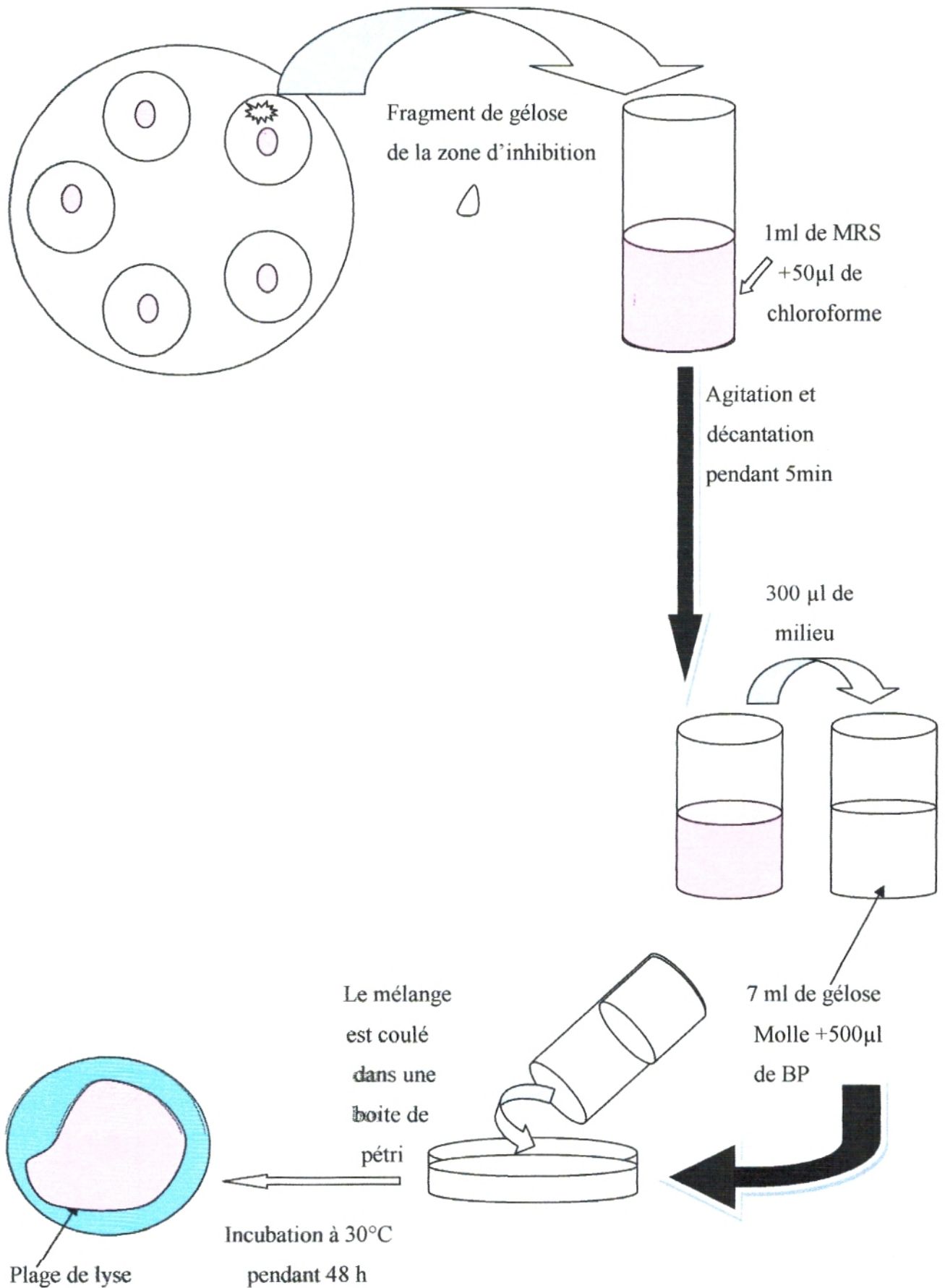
La lecture des résultats consiste à comparer les inhibitions en milieu tamponné et en milieu non tamponné.

III.2 – Inhibition due au phage :

Le but de ce test est de détecter la présence des phages lysogènes.

Selon Hardy et al ., (1987) on prélève un fragment de gélose dans la zone d'inhibition formées autour des bactéries lactiques qu'on met dans 1 ml de milieu MRS liquide, on ajoute 50µl de chloroforme. Après agitation on laisse décanter pendant 5 minutes puis on prélève 300 µl de gélose molle en surfusion contenant 500 µl d'une culture pathogène de 24h. Le mélange est coulé stérilement dans une boîte de Pétri. On laisse incuber à 30°C pendant 48h.

-La lecture des résultats consiste à observer s'il ya présence ou pas de phages de lyse.



due aux phages

Figure 02 : Recherche des plages lysogènes.

III.3 – Inhibition due au peroxyde d'hydrogène :

La multiplication de certaines cultures lactiques entraîne la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) considéré comme inhibiteur de la croissance bactérienne. (Juillard et al., 1987). Le peroxyde d'hydrogène sécrété par les bactéries lactiques peut être dégradé par l'enzyme catalase présente chez certaines espèces bactériennes.

Pour révéler cette inhibition on utilise toujours la méthode de Fleming et al., (1975) en ajoutant cette fois ci dans la gélose semi-solide une goutte de l'enzyme catalase.

- Des milieux témoins sans catalase sont étudiés en suivant la même méthode.

S'il ya absence de zones d'inhibition dans le milieu contenant la catalase cela signifie que l'inhibition est due au peroxyde d'hydrogène.

III.4 – Inhibition due aux bactériocines :

Les bactériocines sont des peptides ou des complexes de peptides (généralement 30 à 60 acides aminés) synthétisées au niveau du ribosome et qui ont un effet bactériostatique ou bactéricide (Garneau et al., 2002).

La recherche des bactériocine est faite de la manière suivante :

Deux enzymes protéolytiques : la pepsine et une protéinase K sont testées.

On applique toujours la méthode de Fleming et al., (1975) sauf que cette fois ci chaque enzyme est dissoute dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH =7 à une concentration de 10 mg/ml. Les bactéries lactiques sont ensemencées par touche après 24h d'incubation à 30°C on les recouvre avec 8 ml de gélose nutritive semi-solide contenant 500µl de la culture pathogène et 400 µl de la solution d'enzyme.

Les résultats obtenus consistent à comparer les inhibitions en présence et en absence d'enzymes protéolytiques.

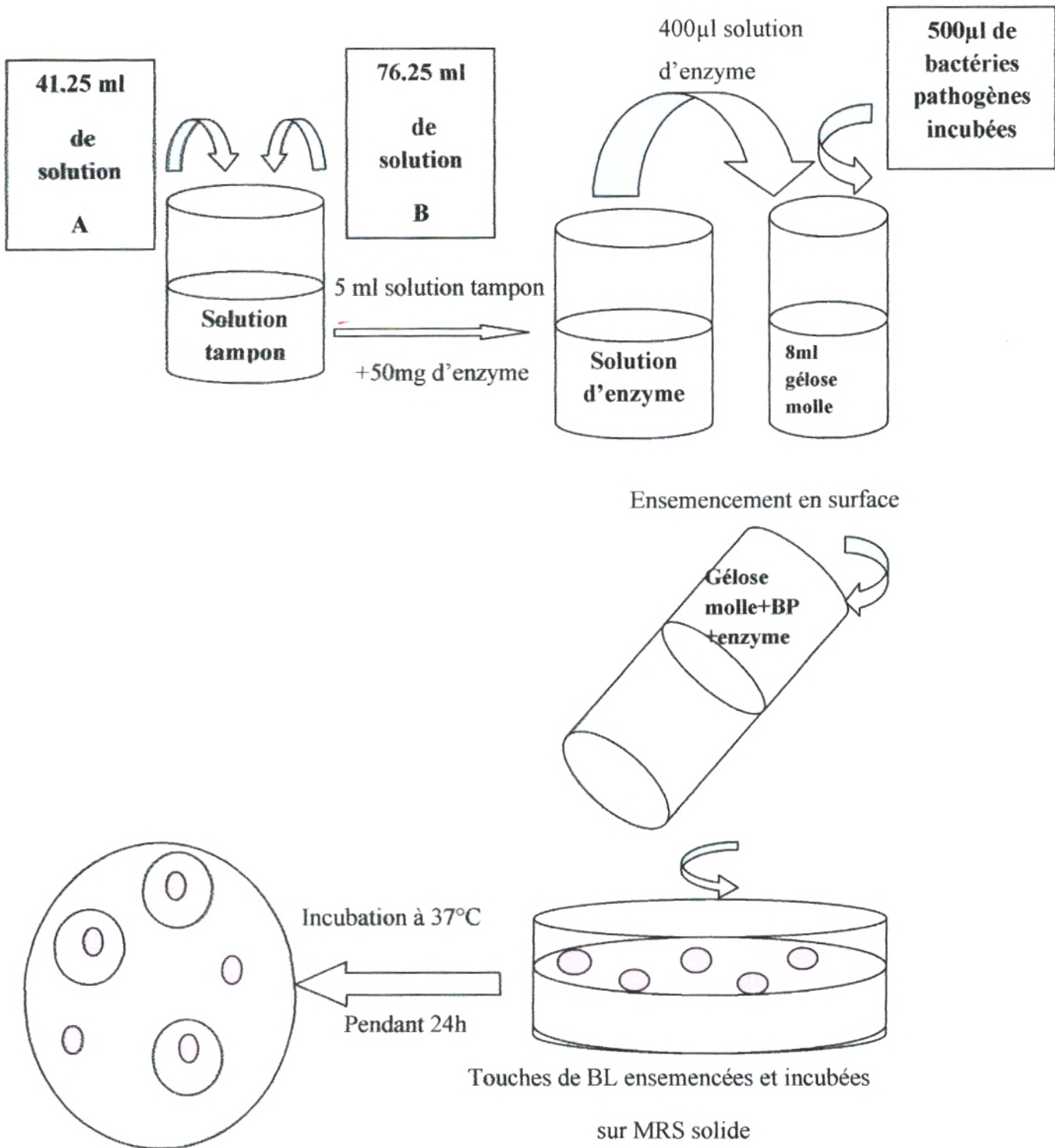


Figure 03: *détection des inhibitions par les bactériocines.*

IV. Effet bactéricide ou bactériostatique :

Les souches de *Lactococcus sp* sont testées si leur effet inhibiteur est bactéricide ou bactériostatique, pour cela on découpe un morceau de gélose dans la zone d'inhibition et on procède de deux manières :

-La première consiste à le mettre dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif. Après incubation de 24h à 37°C l'apparition de trouble dans le tube permet de déduire que les bactéries pathogènes ont toujours le pouvoir pathogène et donc l'effet inhibiteur est bactériostatique. Au contraire si le contenu de tube reste clair ceci confirme que l'effet inhibiteur est bactéricide et par conséquent les bactéries pathogènes ont été complètement tuées par les facteurs inhibiteurs.

-La deuxième procédure consiste à ensemencer ce fragment de gélose en stries à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec une gélose nutritive. Après incubation de 24h à 37°C, s'il ya croissance bactérienne à la surface cela veut dire que l'effet est bactériostatique, s'il ya absence de germes sur la gélose l'effet est donc bactéricide.

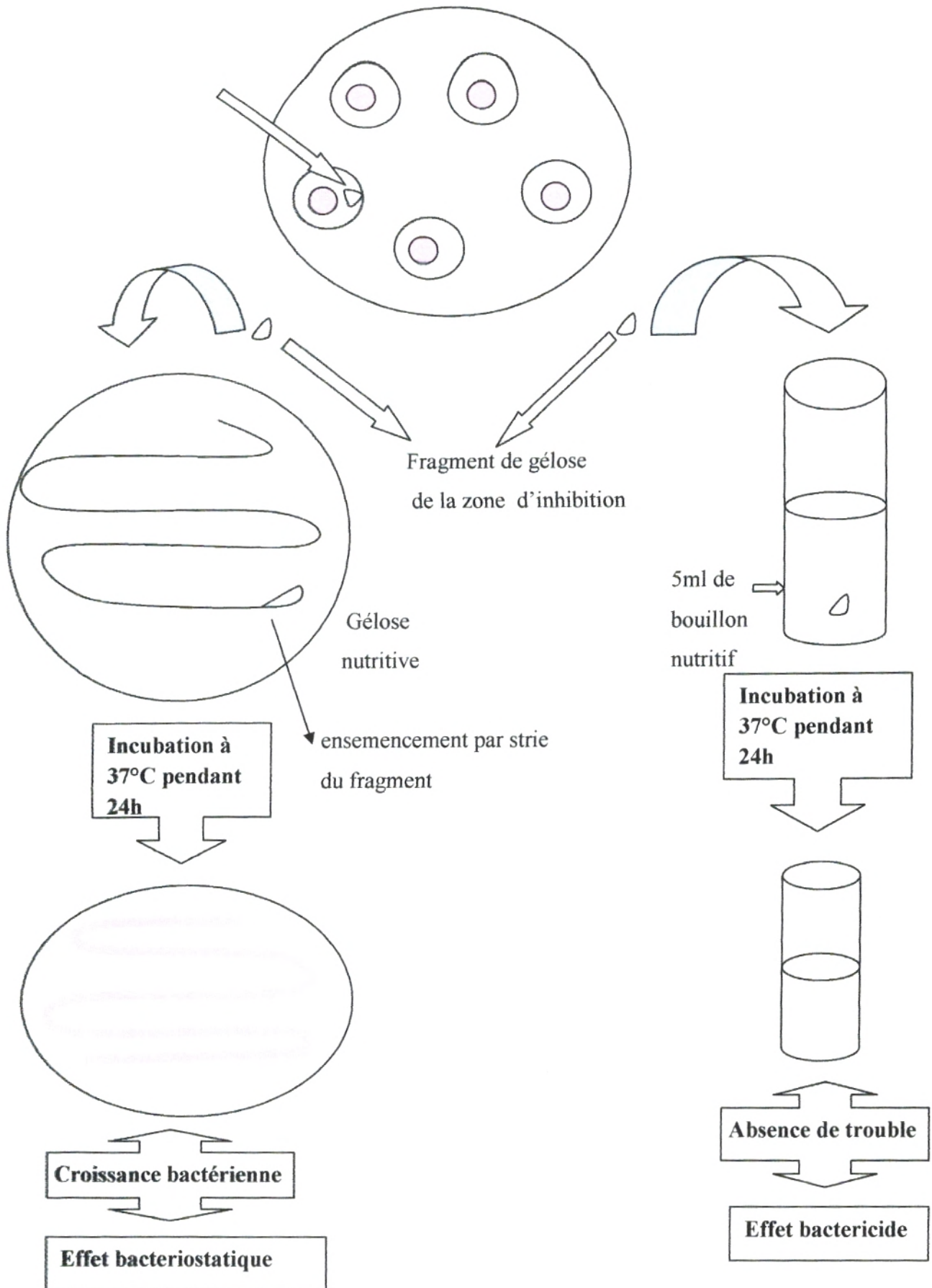


Figure 04: détection de l'effet bactériostatique et l'effet bactéricide.

V. Interaction entre les souches de *Lactococcus* :

On a testé l'effet inhibiteur des bactéries entre elles en suivant toujours la méthode de Fleming et al., (1975) c'est-à-dire que les bactéries pathogènes sont remplacées par les bactéries lactiques

Cette interaction permet de savoir s'il ya un effet antagoniste entre bactéries lactiques et/ou une auto-inhibition.

VI. Action de la nisine sur les bactéries pathogènes :

La nisine est l'une des bactériocines produite par l'espèce *Lactococcus lactis* ayant une forte capacité d'inhiber la flore nuisible. Elle est la seule à être utilisée à l'échelle industrielle comme bioconservateur. Dans ce contexte nous avons mis les bactéries pathogènes en contact de la nisine.

VI.1 – Préparation de la solution de nisine :

La solution de nisine est préparée en dissolvant 3,7g de nisine dans 100 ml d'eau distillée auquel est ajouté 0,2% de Tween 80. Le mélange est mis dans un flacon et couvert avec le papier d'aluminium pour obtenir un endroit sombre, puis stocké au congélateur à l'abri de la lumière.

VI.2 – Test de sensibilité :

La sensibilité des bactéries pathogènes à la nisine a été détectée par deux méthodes l'une des disques et l'autre des puits.

➤ Méthode des disques :

Après revivification des bactéries pathogènes dans un bouillon nutritif les cultures sont ensemencées par râteau à la surface d'une gélose nutritive. Puis des disques de papier Wattman sont déposés à la surface de la gélose et imprégnés de la solution de nisine. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

➤ Méthode de puits :

Cette méthode consiste à creuser des puits à l'aide de l'extrémité plate d'une pipette Pasteur dans des géloses en boîtes de Pétri préalablement ensemencées par râteau par la culture pathogène. Les puits sont remplis par la solution de nisine puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'action inhibitrice de la nisine se traduit par la formation d'un halo clair autour des puits et des disques.

I. Caractéristiques des bactéries pathogènes :

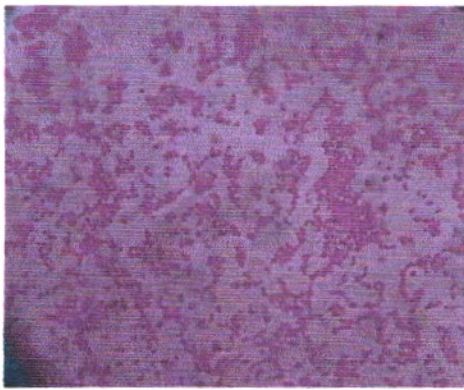
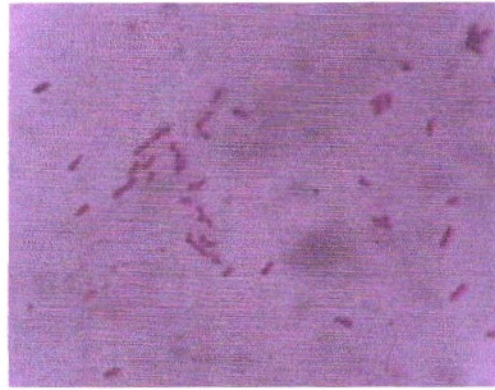
Le tableau ci-dessous nous résume les caractères phénotypiques recherchés des bactéries pathogènes utilisées.

Tableau 02. : Caractères phénotypiques des bactéries pathogènes.

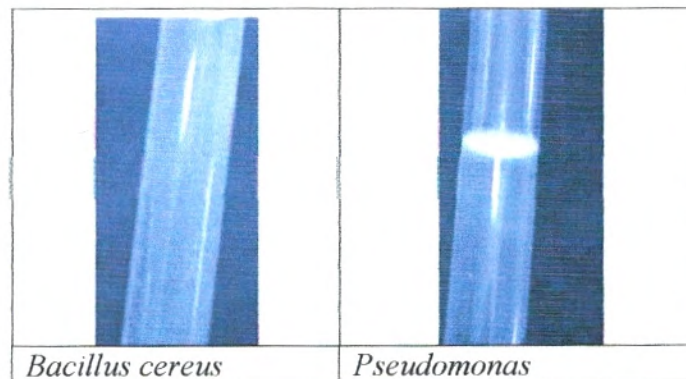
Tests Micro-organismes	Observation microscopique	Coloration de Gram	Type respiratoire	Catalase
<i>E.coli</i>	Bacille	-	Aéro-anaérobie facultatif	+
<i>Salmonella</i>	Bacille	-	Aéro-anaérobie facultatif	+
<i>Enterobacter</i>	Bacille	-	Aéro-anaérobie facultatif	+
<i>Pseudomonas</i>	Bacille	-	Aérobie stricte	+
<i>Listeria</i>	Bacille	+	Aéro-anaérobie facultatif	+
<i>Klebsciella</i>	Bacille	-	Aéro-anaérobie facultatif	+
<i>B.cereus</i>	Bacille	+	Aéro-anaérobie facultatif	+
<i>staphylocoque</i>	Cocci	+	Aéro-anaérobie facultatif	+

I.1 – Aspect microscopique :

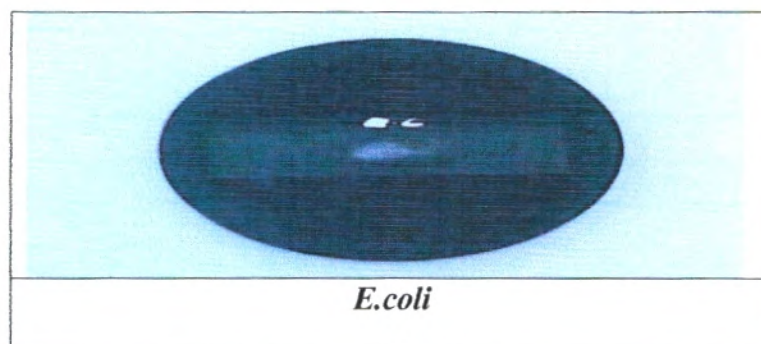
L'observation microscopique et la coloration de Gram ont montré que toutes les bactéries pathogènes sont des bacilles à Gram négatif, *Listeria* est un bacille à Gram positif et *Staphylocoque* est un cocci à Gram positif.

*Staphylocoque**E.coli***Figure 05** : Observation microscopique après coloration des bactéries pathogènes (Gr×100)**I.2 – Type respiratoire :**

Toutes les bactéries testées sont aéro-anaérobie facultatif sauf *Pseudomonas* est aérobie strict.

**Figure 06** : Observation du type respiratoire des bactéries pathogènes.**I.3 – Test de catalase :**

Toutes les bactéries pathogènes dégagent le gaz ce qui explique qu'elles possèdent l'enzyme catalase.

**Figure 07** : Confirmation du test de catalase.

II- Détermination de l'inhibition :

L'interaction entre les bactéries pathogènes et les bactéries lactiques provoque la sécrétion de métabolites inhibiteurs des germes indésirables. Cette inhibition peut être due aux produits du catabolisme : production d'acide organique, de peroxyde d'hydrogène et/ou de bactériocines.

II.1 – Mise en évidence des inhibitions :

L'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques est détectée en utilisant la méthode de Fleming et *al.*, (1975).

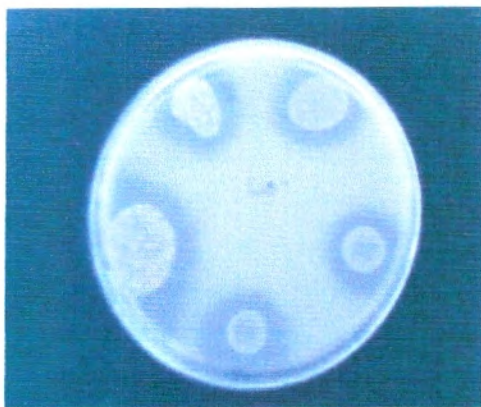
La figure (4) nous montre que les 5 souches de *Lactococcus* ont un effet antagoniste sur les bactéries pathogènes vu qu'il y a formation de zones d'inhibitions tout autour.



E.coli



Staphylocoque



Listeria



Salmonella

Figure 08: détermination des inhibitions par les bactéries lactiques à l'égard des bactéries pathogènes.

II.2 – Détermination de la nature d'inhibition :

Les bactéries lactiques inhibent la croissance des bactéries indésirables par différents métabolites dont la présence d'inhibition ne signifie pas uniquement la production des bactériocines. Pour cela nous avons réalisé plusieurs tests pour connaître la nature exacte de l'agent inhibiteur qui peut être : un acide organique, le peroxyde d'hydrogène, un phage ou alors une bactériocines.

II.2.1 – Inhibition due à l'acidité :

La production d'acides notamment l'acide lactique est l'un des caractères important des bactéries lactiques dans l'inhibition d'autres flores microbiennes. Pour minimiser la production d'acide nous avons utilisé un milieu MRS tamponné avec du tampon phosphate à pH =7.

Le milieu de culture utilisé est préparé avec 0.25% de glucose

Les résultats obtenus sont comparés à ceux d'un milieu témoin non tamponné.

Tableau 03 : Zones d'inhibitions (en mm) formées par la production d'acide.

BP BL	<i>E.coli</i>		<i>klebsiella</i>		<i>pseudomonas</i>		<i>Listeria</i>		<i>staphylocoque</i>		<i>Enterobacter</i>		<i>Salmonella</i>		<i>B.cereus</i> (C)		<i>B.cereus</i> (R)
	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT
Lclj3	30	00	22	00	20	00	25	00	23	00	24	00	21	00	27	00	23
Lclj4	27	00	28	00	19	00	21	00	29	00	26	00	35	00	24	00	28
Lcdj1	30	00	26	00	39	00	27	00	24	00	33	00	29	00	26	00	29
Lcdj2	31	00	22	00	23	00	22	00	21	00	24	00	23	00	29	00	22
Lcdj3	27	00	23	00	17	00	18	00	24	00	21	00	18	00	30	00	20

BL : bactéries lactiques.

T : tampon

BP : bactéries pathogènes.

NT : non tampon

Dans le milieu tamponné il ya absence de zones d'inhibition pour toutes les bactéries pathogènes. Ceci signifie que l'acide produit est un facteur inhibiteur

II.2.2 – Inhibition due aux phages :

Les phages lysogènes peuvent être un facteur responsable des inhibitions des bactéries indésirables. De ce fait nous avons réalisé un test de détection des phages.

Les résultats trouvés ont montrés l'absence totale des plages de lyse.

II.2.3 – Inhibition due au peroxyde d'hydrogène :

Les souches lactiques sont examinées pour leurs effets inhibiteurs vis-à-vis des bactéries pathogènes en présence d'enzyme catalase.

Les résultats obtenus en présence et en absence de catalase sont représentés dans les figures suivantes :

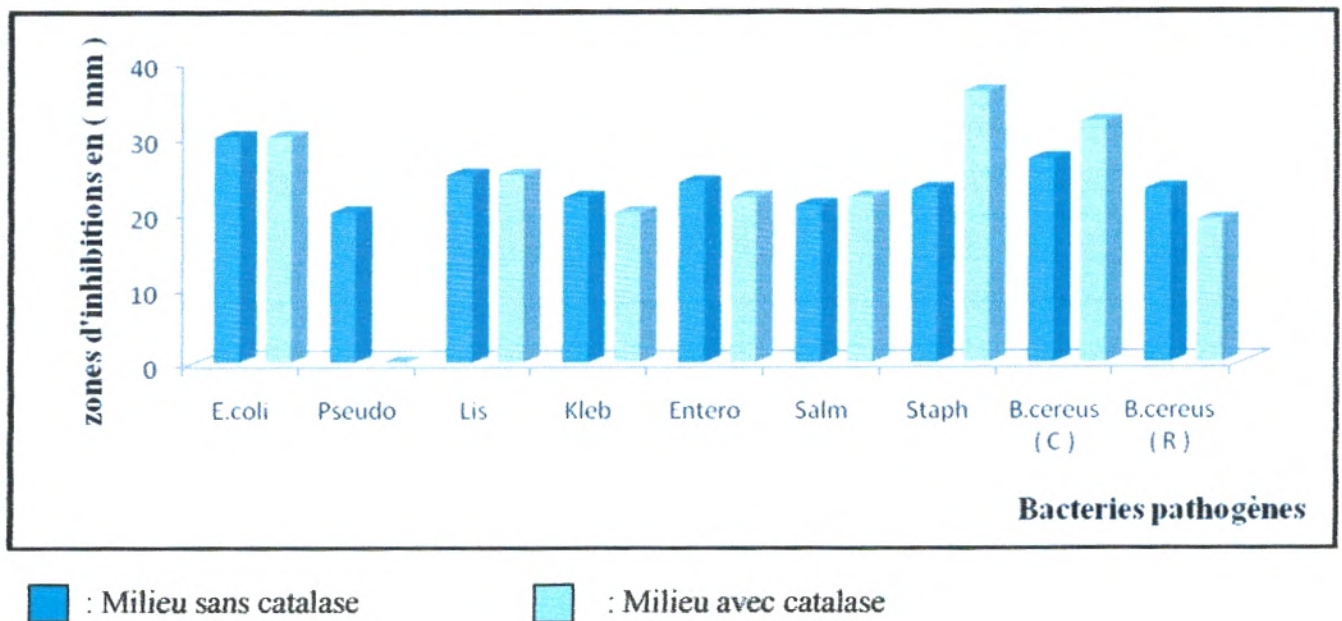


Figure 09: Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lclj3

La souche Lclj3 inhibe *Pseudomonas* par production de peroxyde d'hydrogène qui a été dégradé par la catalase, puisqu'il y a absence de zone dans le milieu contenant la catalase, ceci signifie que l'inhibition est due uniquement au peroxyde d'hydrogène.

Cependant il y a une légère inhibition de *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Bacillus cereus* (R). Les zones d'inhibition ont diminué et n'ont pas disparu il existe alors un autre facteur inhibiteur autre que le peroxyde d'hydrogène.

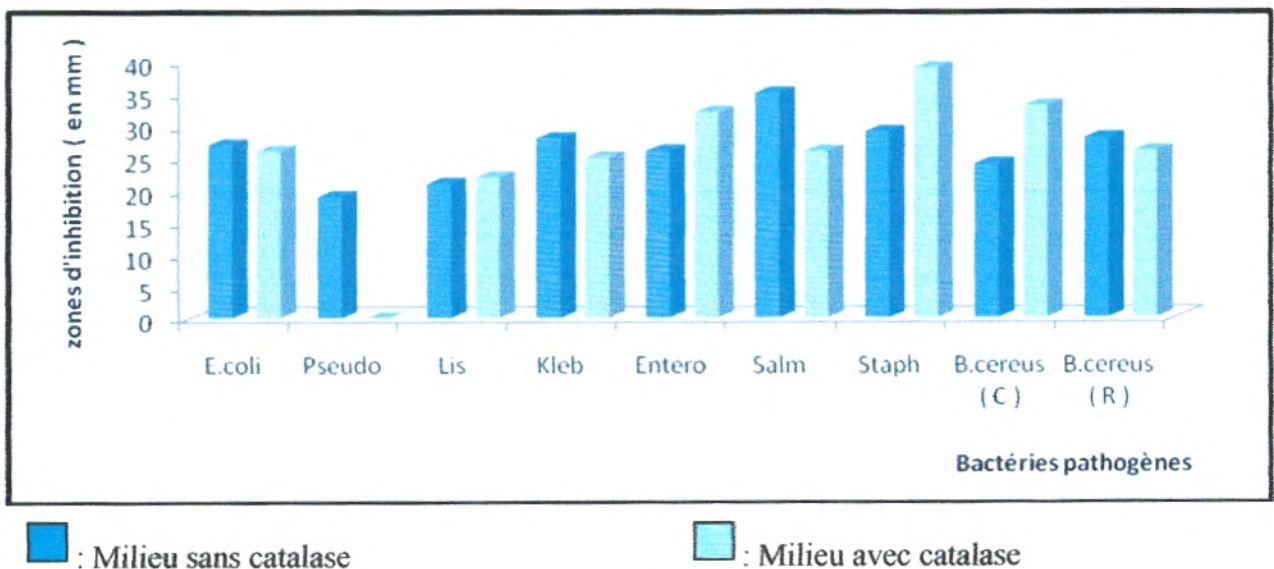


Figure 10 : Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lclj4.

Seule l'espèce *Pseudomonas* est inhibée totalement par la souche Lclj4. Ceci montre que l'inhibition est due uniquement au peroxyde d'hydrogène. Parallèlement il ya une diminution des zones d'inhibitions pour *Klebsiella*, *Salmonella* et *Bacillus .cereus* (R) ce qui traduit la production d'autres facteurs inhibiteurs autre que le H_2O_2 .

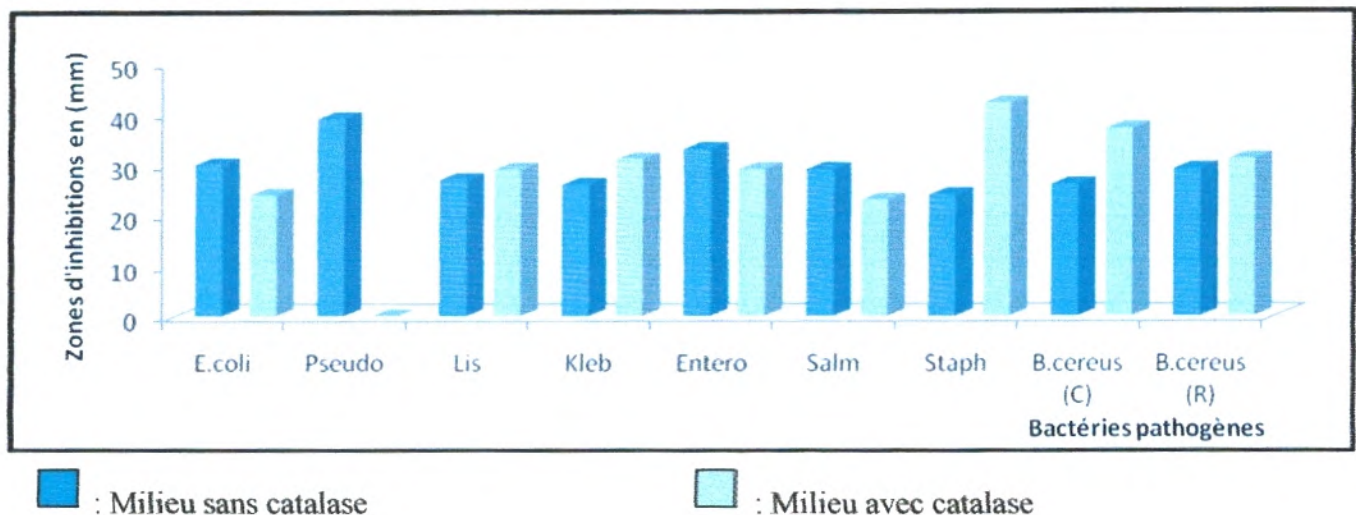


Figure 11 : Inhibition due au peroxyde d'hydrogène produit par la souche Lcdj1

Lcdj1 inhibe aussi *Pseudomonas* par production de peroxyde d'hydrogène puisqu'il ya absence de zone d'inhibition alors qu'elle inhibe légèrement *E.coli*, *Enterobacter* et *Salmonella*. Puisque les zones d'inhibitions ont diminué seulement pour ces trois bactéries on peut dire qu'il ya un autre facteur inhibiteur autre que le peroxyde d'hydrogène.

La souche Lcdj3 inhibe aussi *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Bacillus cereus* (C) mais légèrement puisque les zones d'inhibitions ont diminué alors on peut dire qu'il ya un autre facteur inhibiteur autre que le peroxyde d'hydrogène.

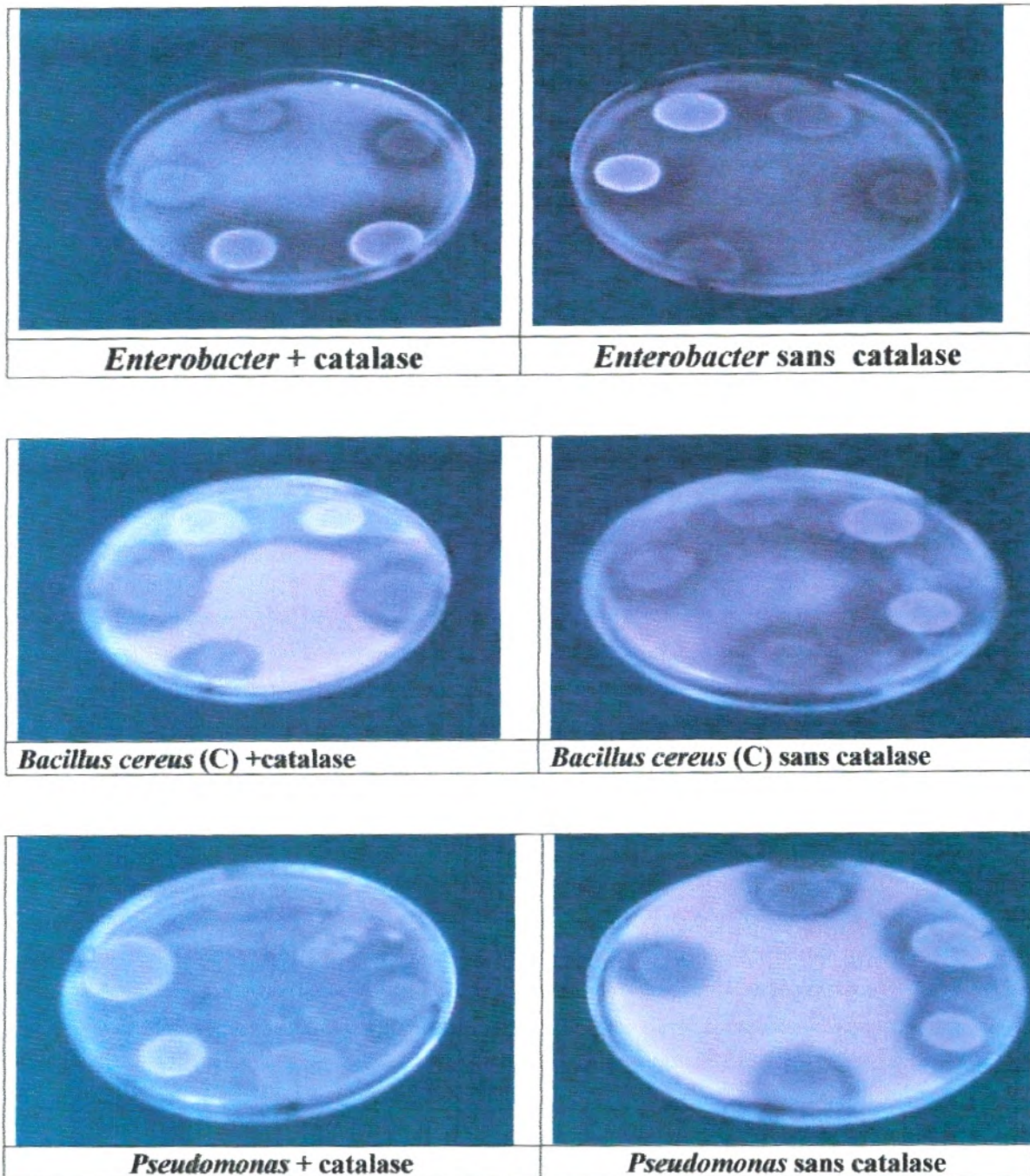
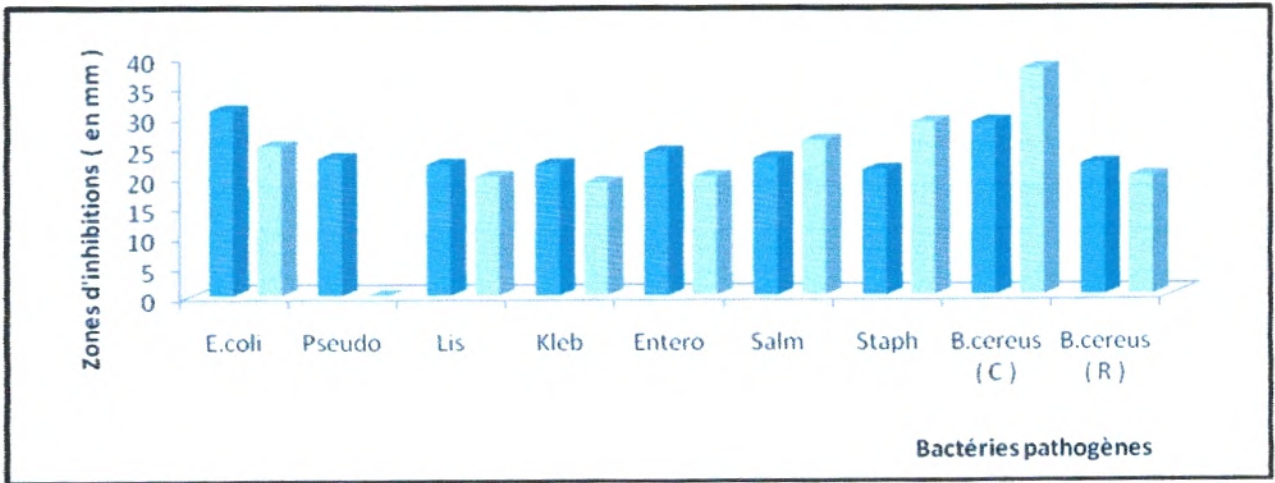


Figure 14: Zones d'inhibitions formées par le peroxyde d'hydrogène.

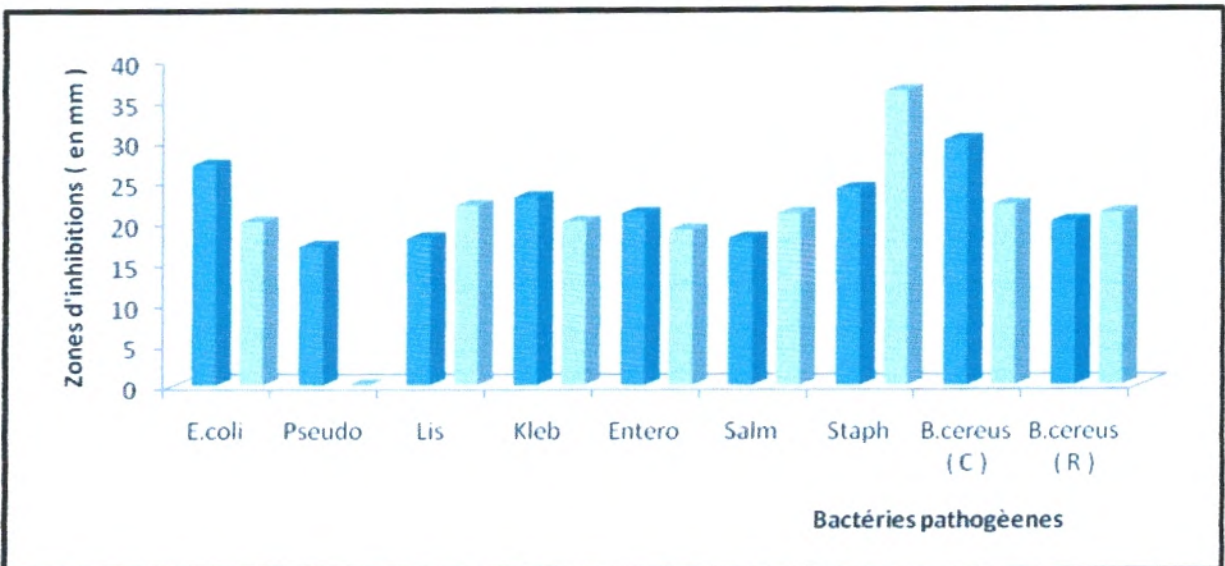


■ : Milieu sans catalase

■ : Milieu avec catalase

Figure 12 : Inhibition due au peroxyde d’hydrogène produit par la souche Lcdj2

Une inhibition totale de *Pseudomonas* est observée par production de peroxyde d’hydrogène par la souche Lcdj2. Alors qu’il ya une diminution des zones d’inhibitions autour de *Listeria*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *B.cereus* (R).



■ : Milieu sans catalase

■ : Milieu avec catalase

Figure 13 : Inhibition due au peroxyde d’hydrogène produit par la souche Lcdj3

Seule l’espèce *Pseudomonas* est inhibée totalement par production de peroxyde d’hydrogène ceci explique que le facteur inhibiteur est le peroxyde d’hydrogène produit par la souche Lcdj3.

II.2.4 – Inhibition due aux bactériocines :

Les bactériocines sont des peptides antibactériens. Elles présentent un spectre d'activité étroit envers des espèces pathogènes. Elles ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide. Elles sont inactivées par les protéases et sont thermostables. (Aymerich et al., 2000).

Dans notre travail nous avons testées deux enzymes de nature protéolytique : la protéinase K et la pepsine.

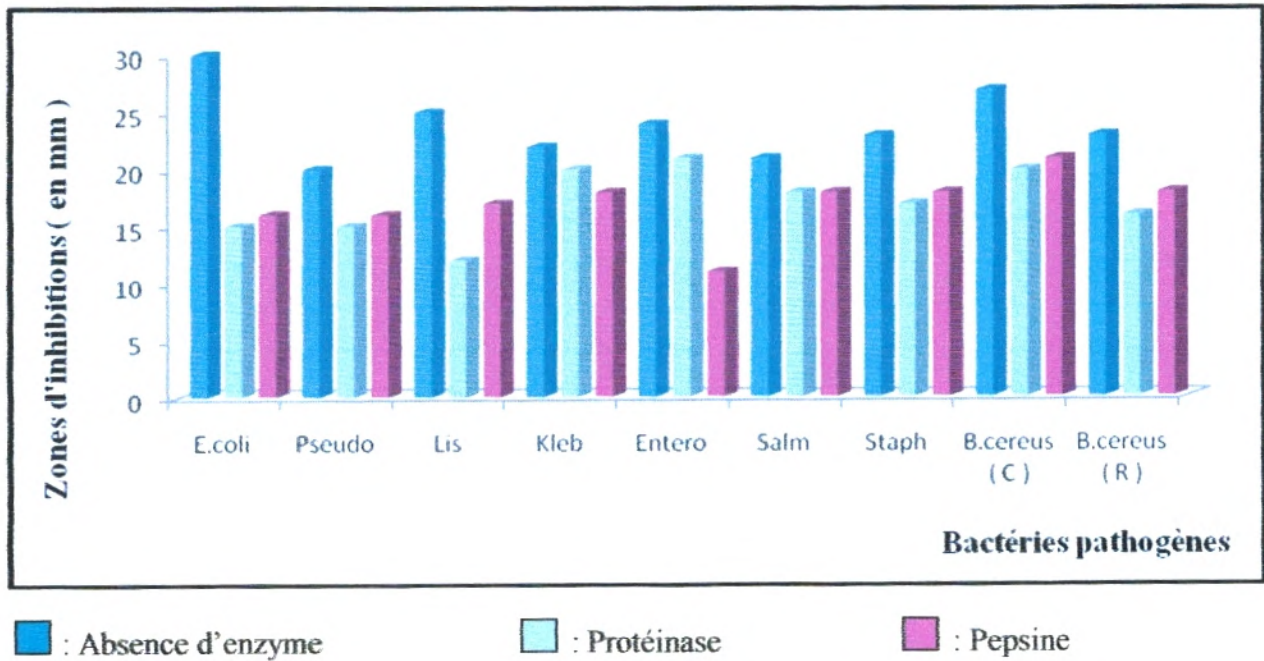
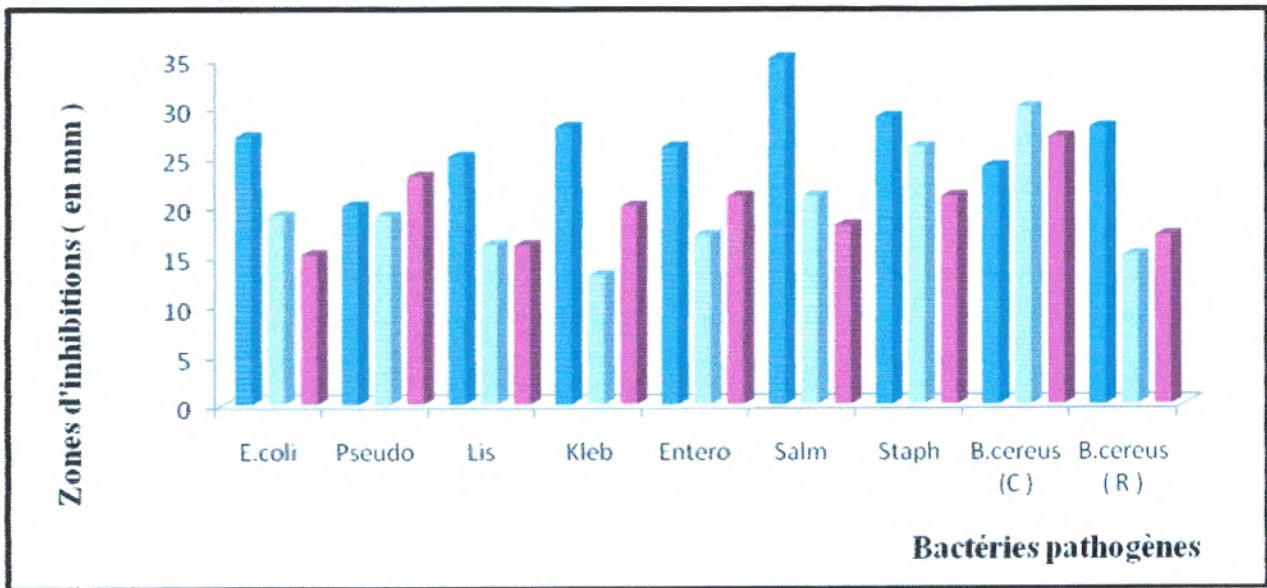


Figure 15: Inhibition due aux bactériocines de Lclj3

Lclj3 a inhibé toutes les bactéries pathogènes par production de bactériocine de nature protéique vu la diminution de l'halo d'inhibition qui explique la dégradation de cette bactériocine par les enzymes protéolytiques. La bactériocine qui agit sur les bactéries pathogènes est sensible aux deux enzymes.

La diminution des zones d'inhibitions explique qu'il y a d'autres bactériocines de nature glycoprotéiques ou lipoprotéiques.

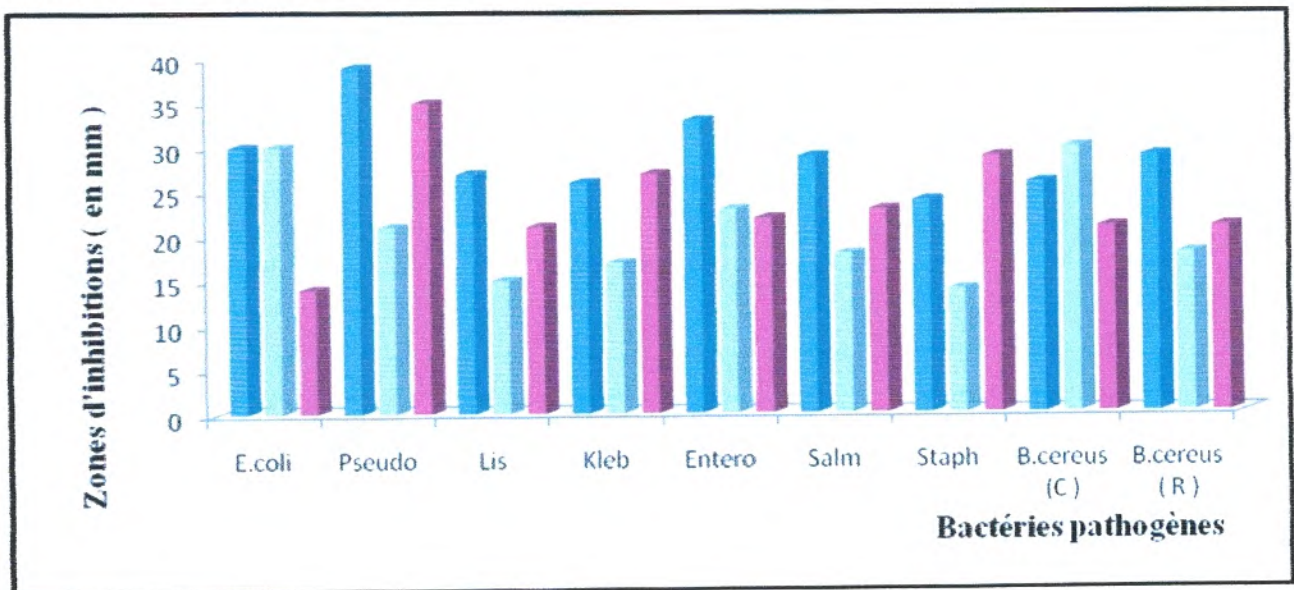


■ : Absence d'enzyme ■ : Protéinase ■ : Pepsine

Figure 16 : Inhibition due aux bactériocines de Lclj4

A l'exception de *Bacillus.cereus* (c), la souche Lclj4 a inhibé toutes les autres bactéries pathogènes par production de bactériocines sensible aux deux enzymes.

Pour *Pseudomonas* la bactériocine est sensible à la protéinase seulement, on peut dire alors que Lclj4 produit deux types de bactériocines.



■ : Absence d'enzyme ■ : Protéinase ■ : Pepsine

Figure 17: Inhibition due aux bactériocines de Lcdj1

Lcdj1 agit sur toutes les bactéries pathogènes par production de bactériocines vu la diminution des zones d'inhibitions.

La bactériocine qui agit sur *Staphylocoque* et *Klebsiella* est sensible à la protéinase alors que la bactériocine qui a agit sur *Bacillus.cereus* (c) et *E.coli* est sensible à la pepsine. On peut déduire que Lcdj1 secrète deux bactériocines différentes.

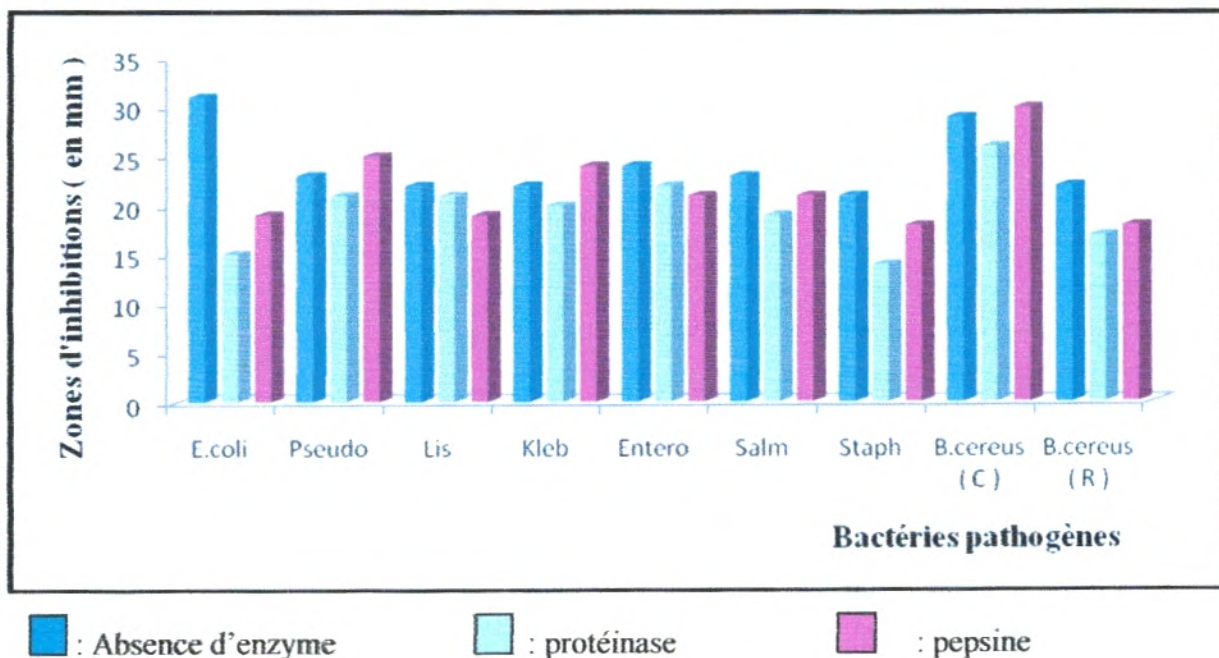


Figure 18 : Inhibition due aux bactériocines de Lcdj2

Lcdj2 agit sur *Pseudomonas*, *Klebsiella* et *B.cereus* (C) en produisant une bactériocine sensible à la protéinase. La diminution seulement des zones d'inhibitions montre qu'il ya d'autres bactériocines de nature glycoprotéiques ou lipoprotéiques.

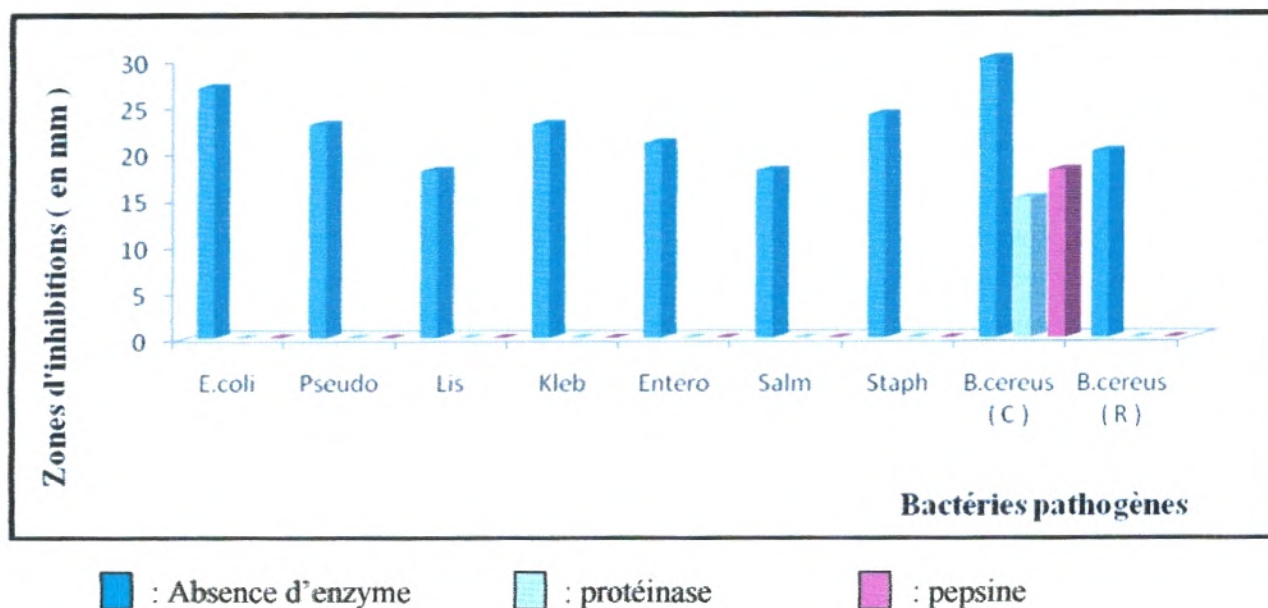


Figure 19 : Inhibition due aux bactériocines de Lcdj3

Pour le cas de Lcdj3 l'ensemble des bactéries pathogènes est inhibé par la production de bactériocines ceci explique que l'inhibition est due aux bactériocines.

Puisque la zone d'inhibition a diminué et n'a pas disparu pour le cas de *Bacillus cereus* (c) ceci explique la présence d'autre bactériocine de nature glycoprotéique ou lipoprotéique.

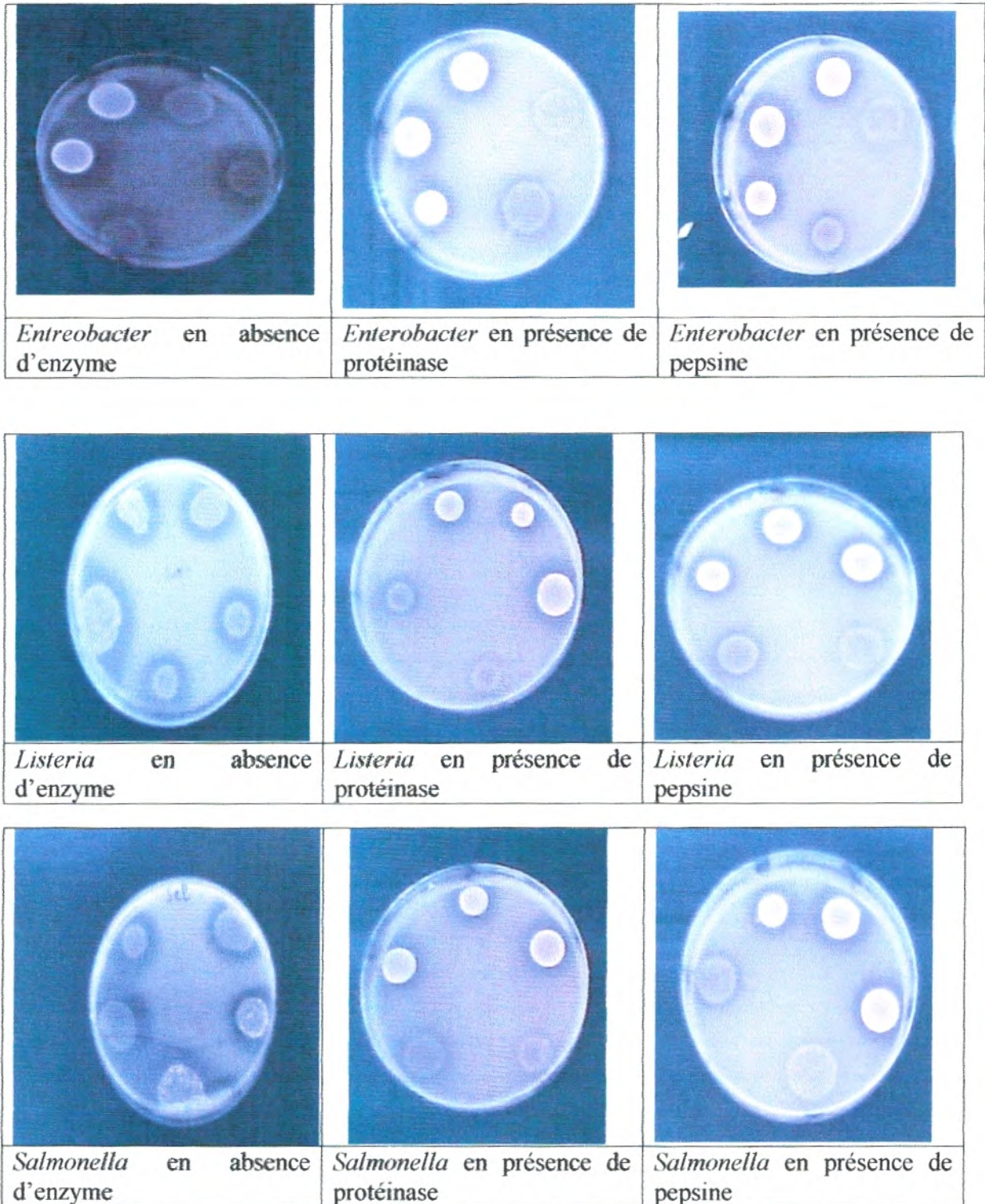


Figure 20 : Zones d'inhibitions formées par les bactériocines.

III. Effet bactériostatique ou bactéricide :

Le tableau suivant montre l'absence ou la présence de germes pathogènes après inhibition par les bactéries lactiques.

Tableau 04 : Effet bactériostatique ou bactéricide des bactéries pathogènes.

	Lclj3	Lclj4	Lcdj1	Lcdj2	Lcdj3
E.coli	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique
Klebsiella	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique
Listeria	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique
Enterobacter	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique
Pseudomonas	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique
Staphylocoque	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique
Salmonella	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactéricide
Bacillus cereus (c)	Bactéricide	Bactéricide	±Bactéricide	Bactéricide	±bactéricide
Bacillus cereus (R)	Bactéricide	Bactéricide	Bactéricide	Bactéricide	Bactéricide

On a constaté que la plus part des bactéries lactiques ont un effet inhibiteur bactériostatique du fait qu'il ya apparition de trouble dans les bouillons nutritifs et développement de colonies à la surface des géloses.

D'autres souches lactiques ont un effet bactéricide tel que la souche Lcdj3 en contact de *Salmonella* et Lclj3, Lclj4, Lcdj1, Lcdj2 et Lcdj3 en contact de *Bacillus cereus* (R) et *Bacillus cereus* (C).

Certaines bactéries lactiques comme Lclj4 et Lcdj3 ont montré un léger effet bactéricide vis-à-vis *Bacillus cereus* (C) puisqu'il ya eu apparition de très peu de colonies.

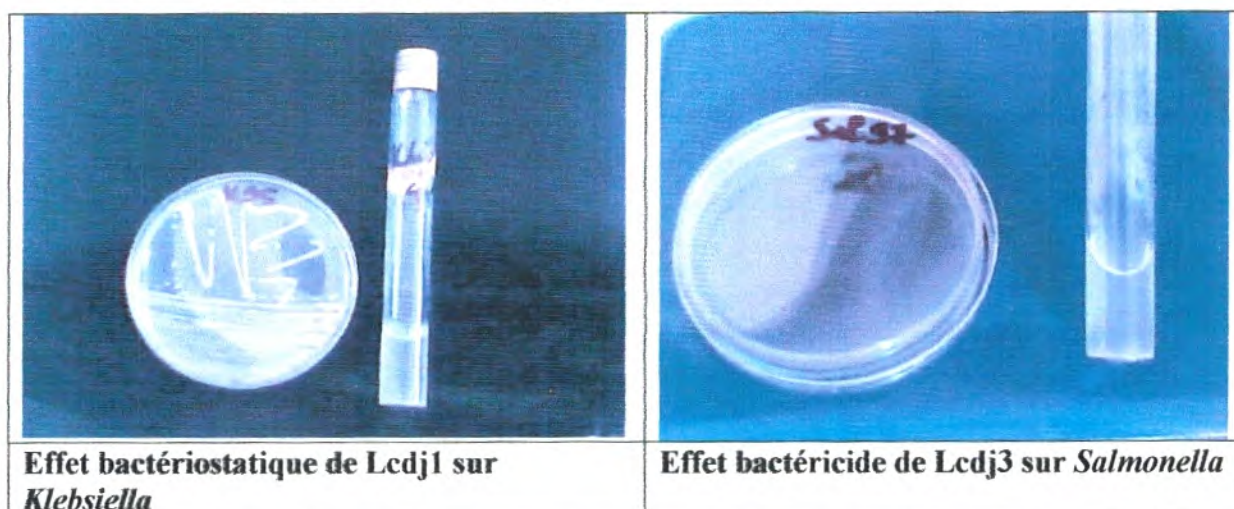


Figure 21 : Effet bactéricide et bactériostatique des souches lactiques

IV. Interactions entre bactéries lactiques :

Les résultats de l'effet antagoniste entre les bactéries lactiques sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 05: Zones d'inhibitions formées (en mm) entre les souches lactiques.

BL ind \ BL inh	Lclj3	Lclj4	Lcdj1	Lcdj2	Lcdj3
Lclj3	00	00	00	00	34
Lclj4	22	21	16	14	38
Lcdj1	25	21	17	13	33
Lcdj2	00	00	18	17	35
Lcdj3	00	00	00	00	35

BL inh : bactéries lactiques inhibitrices.

BL ind : bactéries lactiques indicatrices.

Les souches lactiques peuvent s'inhiber entre elles et présentent des zones d'inhibitions allant de 14mm jusqu'à 35mm. Les deux souches Lclj3 et Lcdj3 n'inhibent pas les autres bactéries lactiques sauf la souche Lcdj3 avec des zones d'inhibitions très importantes de 34mm à 35mm.

Elles peuvent aussi effectuer des auto-inhibitions telles que Lclj4 avec Lclj4 et Lcdj3 avec Lcdj3 dont les zones sont très importantes (21 mm et 35 mm) sauf la souche Lclj3 qui ne présente pas d'auto-inhibition.

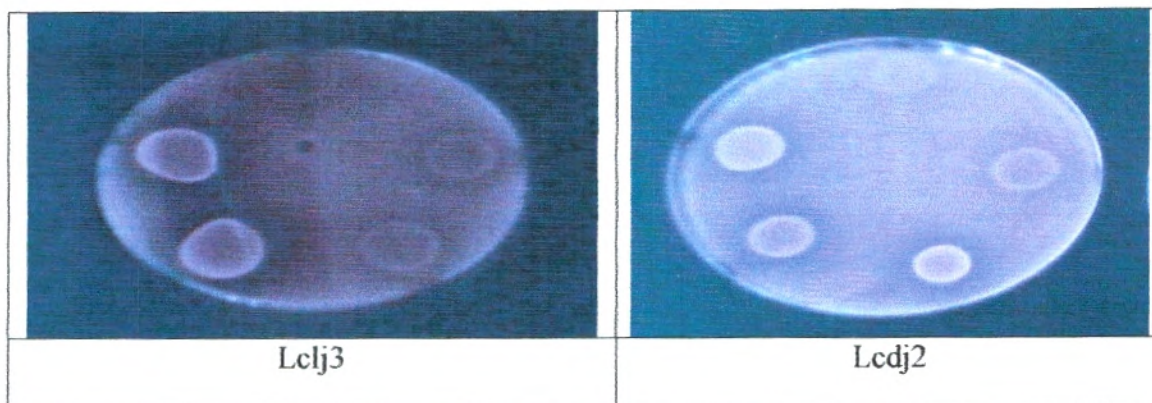


Figure 22 : Interactions entre les bactéries lactiques.

V. Action de la nisine sur les bactéries pathogènes :

L'action de la nisine sur les bactéries pathogènes est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 06 : Zones d'inhibition formées en (mm).

Souches	Zones d'inhibitions
E.coli	14
Salmonella	14
Listeria	11
Klebsiella	10
Staphylocoque	11
Pseudomonas	12
Enterobacter	9
B.cereus (C)	12
B.cereus (R)	18

La nisine agit sur toutes les bactéries pathogènes avec des zones d'inhibitions importantes allant jusqu'à 18 mm pour *Bacillus cereus* (R) d'où son utilisation en tant que conservateur en industrie alimentaire.

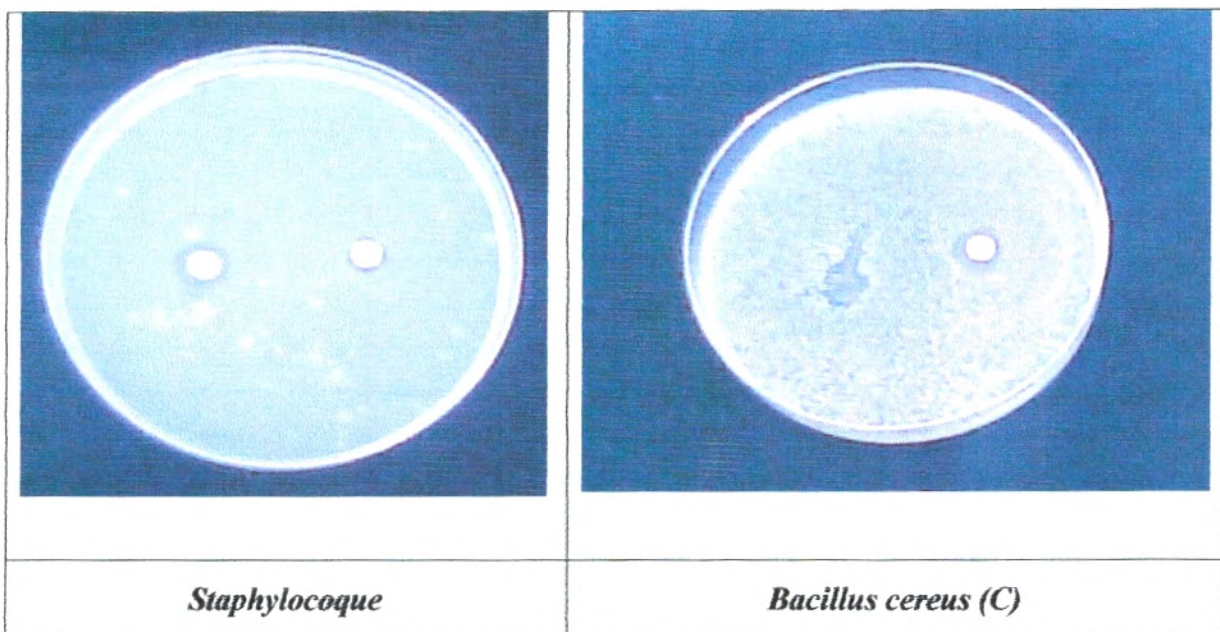


Figure 23: Effet de la nisine sur les bactéries pathogènes (méthode des disques et des puits)

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire pour empêcher la croissance des flores **non lactiques dont certaines sont pathogènes** (Bekhouche et al., 2005).

La recherche des inhibitions existantes entre les souches de *Lactococcus sp* et les bactéries pathogènes nous a permis de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques **du fait** qu'elles produisent des composées antibactériennes qui leur permettent d'être utiliser en tant que bio – conservateurs.

Dans notre travail l'effet antagoniste a été détecté par la méthode de Fleming et al., (1975). Les cinq souches Lclj3 et Lclj4 appartenant à la sous espèce *Lactococcus lactis*, et Lcdj1, Lcdj2 et Lcdj3 appartenant à la sous espèce *Lactococcus diacetylactis* semblent exercer un grand pouvoir inhibiteur sur les neufs bactéries pathogènes testées.

De nombreux travaux montrent cet effet inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes comme : *E.coli*, *Salmonella*, *B.cereus*... etc. Parmi ces travaux ceux de Aymenich et al., (1998); Kostrzynska et Bachand (2006); Herreros et al., (2005); Leroy et al., (2006).

L'apparition des zones d'inhibitions au cours des interactions entre les souches de *Lactococcus sp* et les bactéries nuisibles (figure 08) conduit à rechercher la nature de ces inhibitions qui peuvent être dues aux acides organiques (Barber et Deibel, 1972; Delbes et al., 2006; Lindqvist, Sylven, et Vagsholm, 2002) aux phages (Garry, 2008), au peroxyde d'hydrogène (Otero et Nader-Macias, 2005), ou alors à des bactériocines (Ammor et al., 2006).

En ce qui concerne les phages nous n'avons pas trouvés des plages de lyse. D'après Klaenhammer et Fitzgerald (1994) le mécanisme le plus puissant de la résistance aux phages identifiés chez les Lactocoques ceci confirme nos résultats. Cette infection abortive des phages est liées principalement à certains nombre de gènes présentent chez les Lactocoques tels que : *abiB* (Cluzel et al., 1991), *abiC* (Durmaz et al., 1992), *abiD* (McLandsborough et al., 1995), *abiD1* (Anba et al., 1995), *abiE*, *abiF* (Garvey et al., 1995), *abiG* (O'Connor et al., 1996) et *abiH* (Prevots et al., 1996).

L'inhibition par les souches de *Lactococcus sp* peut être due à la production des acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique produits au cours des processus de fermentation alimentaire. (Davison, 1996).

Les acides organiques sont pour leur effet inhibiteur, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (Alakomi *et al.*, 2000). Ainsi la disparition totale des zones d'inhibitions dans le milieu tamponné par rapport au milieu non tamponné pour toutes les bactéries pathogènes signifie que l'effet inhibiteur est du à l'acide produit (tableau 03) ceci est confirmé par les travaux de Chaikhi et Hadj Abdelkader (2009) qui ont montré que l'acide produit par les *Leuconostoc* inhibe les mêmes bactéries pathogènes que l'on a utilisé sauf *Listeria*.

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase intervenant dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. En conséquence, l' H_2O_2 qui se produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents (Condon, 1987). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (Caplice *et al.*, 1999). Le peroxyde d'hydrogène est également connu pour être bactéricide en fonction de la concentration appliquée et sur les facteurs environnementaux comme le pH et la température (Lluven *et al.*, 1996).

Les résultats obtenus en utilisant la catalase ont montré que toutes les souches lactiques ont inhibées *Pseudomonas* par production de peroxyde d'hydrogène (figure 9, 10, 11, 12 et 13). D'après Gudkow (1987) les *Pseudomonas* sont beaucoup plus sensible au peroxyde d'hydrogène ceci confirme nos résultats.

A l'exception de la souche Lcdj1 appartenant à l'espèce *Lactococcus diacetylactis* 1 toutes les autres souches ont inhibées *Klebsiella* (figure 11). La souche Lcdj3 appartenant à l'espèce *Lactococcus diacetylactis* 3 a inhibée *Bacillus cereus* (C) (figure 13), Lcdj1, Lcdj2 et Lcdj3 ont inhibés *Enterobacter* et *E.coli* (figure 11, 12 et 13).

La souche Lclj4 appartenant à l'espèce *Lactococcus diacetylactis* et Lcdj1 appartenant à l'espèce *Lactococcus diacetylactis* 1 ont inhibées *Salmonella* (figure 10 et 11), Lclj3 et Lcdj2 ont inhibés *Bacillus cereus* (R) et *Listeria* par Lcdj2 seulement (figure 9 et 12).

* D'après Dacosta (2000) l'effet antagoniste des bactéries lactiques est attribué aussi aux bactériocines qui leur sont propre et ayant un effet bactéricide ou bactériostatique.

+ Nos résultats a montré des diminutions de zones par rapport à un milieu sans enzymes ce qui signifie que le facteur inhibiteur est une bactériocine. La recherche des bactériocines dans notre étude on montré que toute les bactéries lactiques testées produisent des substances antibactériennes sensible à la pepsine et à une protéinase.

Les souches Lclj3 et Lclj4 appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* et Lcdj3 appartenant à l'espèce *Lactococcus diacetylactis* ont produit chacune une bactériocine sensible aux deux enzymes sauf que Lclj4 agit sur *Pseudomonas* par une bactériocine sensible à la protéinase seulement (figure 15, 16, 17 et 19). Alors que la souche Lcdj2 appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* 2 a agit sur *Pseudomonas*, *Klebsiella* et *B.cereus* (C) en produisant une bactériocine sensible à la protéinase K, alors qu'elle a inhibé les autres bactéries pathogènes par une bactériocine sensible aux deux enzymes (figure 18) ce qui confirme les travaux de Chikhi et Hadj Abdelkader (2009) qui ont trouvées deux types de bacteriocines produites par les *Leuconostoc*.

Parfois l'action des enzymes protéolytiques n'élimine pas mais diminue légèrement l'inhibition ceci montre que l'agent antagoniste contient seulement un composé mineur de caractère protéiques c'est le cas de bactériocine de nature glycoprotéique ou lipoprotéique (Nissen-Mayer et al., 1993). En effet la diminution des zones d'inhibitions dans notre étude signifie que les bactéries lactiques produisent aussi des bactériocines de nature lipoprotéiques et glycoprotéiques.

Selon Dufour et al., (1991) ; Kojic et al., (1991) les espèces de *Lactococcus diacetylactis* ont une activité antibactérienne due aux deux bactériocines distincts : La bactériocine S50 et WM4.

Toutes les souches lactiques testées ont le pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes par production d'acide, de phages, le peroxyde d'hydrogène et au moins une bactériocine de nature protéique et d'autres de nature glycoprotéiques ou lipoprotéiques.

La majorité des souches lactiques ont présenté un effet bactériostatique vis-à-vis des bactéries pathogènes (tableau 04) sauf Lcdj3 en contact de *Salmonella*, Lclj3, Lclj4, Lcdj1, Lcdj2 et Lcdj3 en contact de *Bacillus cereus* (c) et *Bacillus cereus* (R) ou on a remarqué un effet bactéricide (figure 21) puisqu'il ya absence totale de germes sur la gélose et dans les bouillons. Alors qu'il ya un léger effet bactéricide de Lcdj1 et Lcdj3 contre *B. cereus* (c). Toutes les souches de *Lactococcus sp* ont effectué des inhibitions entre elles et des auto-inhibitions (tableau 05) à l'exception de Lclj3, Lclj4, Lcdj1 et Lcdj2 qui n'ont pas inhibé Lclj3 et Lcdj3.

La nisine est un peptide antimicrobien naturel produit par des souches de *Lactococcus lactis subsp. lactis* qui inhibe efficacement les bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que les spores de *Bacillus* et de *Clostridium*.

En outre il a été utilisé comme un bioconservateur et un agent potentiel dans les produits pharmaceutiques vétérinaires et les soins de santé (De Arauz et al., 2009).

Le test de la nisine effectué sur les bactéries pathogènes a donné un résultat positif pour toutes les bactéries pathogènes avec des zones d'inhibitions très importantes (tableau 06) jusqu'au 18mm dans le cas de *Bacillus cereus* (R) (figure 23). Ces résultats confirment les travaux de Bendaoud et Mehyaoui (2005) qui ont trouvés un effet inhibiteur remarquable de la nisine sur le *Bacillus cereus* (C).

CONCLUSION GENERALE

L'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques appartenant aux espèces *Lactococcus lactis* et *Lactococcus diacetylactis* à l'égard des 9 bactéries pathogènes montre que ces dernières sont sensibles aux cinq souches lactiques.

Cette activité a été étudiée en utilisant la méthode de Fleming *et al.*, (1975).

↳ L'apparition des zones d'inhibition nous a conduits à rechercher la nature de ces inhibitions qui peut être un acide, le peroxyde d'hydrogène, les phages ou alors des bactériocines.

↳ En effet toutes les souches lactiques produisent une ou deux bactériocine de nature protéique et d'autres de nature glycoprotéiques ou lipoprotéiques.

Toutes les souches lactiques produisent en plus de l'acide et des bactériocines, le peroxyde d'hydrogène qui agit sur toutes les bactéries pathogènes sauf Staphylocoque.

L'effet inhibiteur de tous les facteurs est bactériostatique à l'exception Lclj3, lclj4, Lcdj1, Lcdj2 et Lcdj3 sur *Bacillus cereus* (C) et *Bacillus cereus* (R) et Lcdj3 sur *Salmonella* où l'effet est bactéricide.

↳ L'effet antagoniste existe entre les bactéries lactiques sauf pour les souches Lcdj3 et Lclj3. Cette dernière ne présente pas aussi d'auto-inhibition.

La nisine a un effet inhibiteur remarquable sur toutes les bactéries pathogènes surtout sur *Bacillus cereus* (R), dont la zone d'inhibition atteint 18 mm. Ceci confirme son utilité comme conservateur en industrie alimentaire contre les bactéries sporulées et autres.

Nos résultats laissent entrevoir différentes perspectives notamment:

- ❖ Extraire, purifier et identifier les bactériocines détectées.
- ❖ Etudier la stabilité des bactériocines sur des aliments en vue des traitements de conservation surtout les bactériocines de troisième classe qui sont sensibles à la chaleur.
- ❖ Utilisation d'autres bactériocines autre que la nisine dans le domaine agro-alimentaire et autre.

↓A

- ✦ Adams, M.R., Nicolaidis, L. 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control* 8, 227– 239.
- ✦ Alakomi, H. L., E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, and I. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negatives bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol.* 66 (5):2001-5.
- ✦ Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., and Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 2-Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, 17, 462–468.
- ✦ Ananthaswamy, H.N., Eisenstark, A. 1977. Repair of hydrogen peroxide-induced single strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 130, 187–191.
- ✦ Aymerich, M.T., Hugas, M., Monfort, J.M. 1998. Review: bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Sci. Technol. Int.* 4, 141–158.
- ✦ Aymerich (M.T.), Garriga (M.), Monfort (J.M.), Nes (I.), Hugas (M.) .2000. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. - *Food Microbiol.* 17(1), 33-45.

↓B

- ✦ Barber, L. E., and Deibel, R. H. 1972. Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. *Applied Microbiology*, 24, 891–898.
- ✦ Bekhouche.F, Boulahrouf.A.2005. Etude quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de Constantine. *Sciences et Technologie C – N°23, juin*, pp. 38-45.
- ✦ Bendaoud. C, Mehyaoui. H.2005. Etude de l'antagonisme entre flore lactique et flore pathogène: cas de Streptocoques lactiques à l'égard de *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*. Mémoire pour l'obtention d'études supérieures en biologie. Option : Microbiologie. Université de Tlemcen.

- ✚ Block, S.S. 1991. Peroxygen compounds. In: Block, S.S. (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 167–181.
- ✚ Blom, H., and C. Mortvedt .1991. Antimicrobial substances produced by food associated micro-organisms. *Biochem Soc Trans.* 19(3):694-8
- ✚ Borch, E., Wallentin, C., Rosen, M., Bjork, L. 1989. Antibacterial effect of the lactoperoxydase /thiocyanate/hydrogenperoxide system against strains of campylobacter isolates from poultry. *J. Food Protect .* 52, 638-641.
- ✚ Bourgeois.C,Larpent.J.P. 1996. *Microbiologie alimentaire .Tome 2 ; aliments fermentés et fermentation alimentaires*.Ed.Tec et Doc,Lavoisier.

✚ C

- ✚ Caplice.E, Fitzgerald G.F.1999.Food fermentation :role of microorganisms in food production and preservation .*Int J Food Microbiol.*50 (1-2):131-49.
- ✚ Cardinal, M J., Meghrou, J., Lacroix, C. et Simard, R.E. 1997. Isolation of *Lactococcuslactis* strains producing inhibitory activity against *Listeria*. *Food Biotechno L.*, 11(2): 129- 146.
- ✚ Cogan, T. M. 1995. Flavor production by dairy starter cultures. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 79: 49S-64S.
- ✚ Chandrapati, S., and O’Sullivan, D. J.1998. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology*, 63,229-233.
- ✚ Chikhi .I, 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’études en vue d’obtention du diplôme d’ingénieur d’état en biologie. Option : contrôle de qualité et analyses. Université de Tlemcen.
- ✚ Cintas, L.M., Casaus, P., Fernandez, M.F. et Hernandez, P.E.1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA- 1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria *Food MicrobioL.* 15(3): 289-298.
- ✚ Cluzel, P.J., Chopin, A. Ehrlich, S.D. and Chopin, M.C.1991. Phage abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, expression of which is mediated by an iso-ISS1 element. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3547–3551.
- ✚ Cogan , T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B.,Cocconcelli, P.S., Fernandez, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulus,G., Ledda, A., Medina, M., Rea,

M.C., Rodriguez, E. 1997.Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 409-421.

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

✚D

- ✚ Dacosta. Y.2000.la bio-protection des aliments. L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. Rappel de données indispensables. Edition YVES DACOSTA, Paris
- ✚ Davidson, B. E., N. Kordias, M. Dobos, and A. J. Hillier. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70 (2-4):161-83.
- ✚ De Arauz L.J, Jozala A.F, Vessoni T.C and Penna. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Food Science and Technology* 20. 146-154.
- ✚ Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension.*International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- ✚ Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J. F., and Montel, M. C.2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *Journal of Food Protection*, 69, 2161–2167.
- ✚ Devlieghere, F., Vermeiren, L., and Debevere, J.2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.
- ✚ De Vuyst, I., and E.J.Vandamme.1994.Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackies Academic and Professional London.Pp:1-221.
- ✚ De Wit, J.N., Van-Hooydonk, A.C.M. 1996. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.* 50, 227–244.
- ✚ Durmaz, E., Higgins, D.L. and Klaenhammer, T.R.1992.Molecular characterisation of a second abortive phage resistance gene present in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ME2. *J. Bacteriol.* 174, 7463–7469.

✚F

- ✚ Fleming H.P., Etchells J.L. and Costilow R.N. 1975. Microbiological inhibition of isolate of pediococcus from cucumber brine.*Appl. Environ. Microbiol.*Pp:1040-1042.

- ✚ Frankenberg, D., Frankenberg-Schwagner, M., Harbich, R. 1993. Mechanisms of oxygen radiosensitization in irradiated yeast. I. DNA double-strand breakage. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 511–521.

✚G

- ✚ Garneau, S, N, I. Martin, Vederas. 2002. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84:577-592.
- ✚ Garry P., Christeans S et Cartier P. 2008. Procédés de bio-préservation I ifip-Institut du porc, Maisons-Alfort. 2ADIV, ZAC Parc Industriel des Gravanches. Institut de l'élevage.
- ✚ Gilliland S.E. 1985. Concentrated starter culture. *Bacterial starter cultures for food*. Gilliland SE. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 145-157.

✚H

- ✚ Harvey, R. J., Collins, E. B. 1961. Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Bact.* 86: 1301-1306.
- ✚ Hardy K.G. 1987. Methods of studying colicins and their plasmids. IN plasmids, IRL. Press. Pp: 105-161.
- ✚ Herreros M.A, Sandoval H, Gonzalez L, Castro.J.M, Fresno J.M, Tornadijo M.E. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food microbiology* (22) 455-459.
- ✚ Holzapfel, W.H., Geisen, R., 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.

✚I

- ✚ Imlay, J.A., Linn, S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302–1309.

✚J

- ✚ Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud MJ., Boquien C. Y. 1987. Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière, *Lait*, 67, 2, 149-172.

- ✚ Juven, B.J., Pierson, M.D. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification. *J. Food Protect.* 59, 1233–1241.

✚K

- ✚ Klaenthammer, T.R. and Fitzgerald, G.F. 1994. Bacteriophages and bacteriophage resistance. In: Gasson, M.J. and de Vos, W.M (Eds.) *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Blackie, Glasgow, pp. 106–168.
- ✚ Kostrzynska, M., Bachand, A. 2006. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: a review. *Can. J. Microbiol.* 52, 1017–1026.

✚L

- ✚ Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270.
- ✚ Lindqvist, R., Sylven, S., and Vagsholm, I. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 155–170.
- ✚ Liu.2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int.J.Food Microbiol.* 83 (2), 115-131.

✚M

- ✚ Marshal, V.M.E., Reoter, B. 1980. Comparison of the antibacterial activity of the 'hypothiocyanite anion towards' *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 120, 512–516.

✚N

- ✚ Notermans, S., and Heuvelman, C. J. 1983. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 48, 1832–1840.

✚O

- ✚ O'Connor, L., Coffey, A., Daly, C. and Fitzgerald, G.F. 1996. AbiG, a genotypically novel abortive infection mechanism encoded by plasmid pCI 750 of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3075–3082.

- ✚ Oram, J.D, Reiter, B. 1966. The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The effect of the inhibitory system on susceptible and resistant strains of group N streptococci. *Biochem J.*100, 373-381.
- ✚ Otero, M. C., and Nader-Macias, M. E. 2005. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science*, 96, 35–46.

✚ P

- ✚ Parente, E., Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 628-638.
- ✚ Pongtharangkul, T., Demirci, A. 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 268-272.
- ✚ Prevots, F. 1989. Etude des mécanismes de résistance aux phages chez les bactéries lactiques. Disponible sur le site <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=166045>.
- ✚ Prevots, F., Daloyau, M., Bonin, O., Dumont, X. and Tolou, S. 1996. Cloning and sequencing of the novel abortive infection gene *abiH* of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* S94. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 295–299.

✚ R

- ✚ Reiter, B., Harnulv, G. 1984. Lactoperoxidase antibacterial lyzes the antimicrobial system: natural occurrence, biological function and practical applications. *J. Food Protect.* 47, 724–732.
- ✚ Rodriguez, J.M, Cintas, L.M., Casaus, P., Horn, Nb, Dodd, &M., Hernandez, P.E. et Gasson, M J. 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 78(2): 109- 115.
- ✚ Rossland, E., Langsrud, T., Granum, P.E., Sorhaug, T. 2005. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *B. cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 98, 193–200.

✚ S

- ✚ Steele, J.L. 1998. Genetics and metabolism of starter cultures. In: *Applied Dairy Microbiology*, Ed. E. H. Marth, J. L. Steele, Marcel Dekker, INC., New York. 173-193.

↓ T

- ↓ Toledo, R.T. 1975. Chemical sterilants for aseptic packaging. medicinal plants for antibacterial properties. J. Entophar- Food Technol. 29, 102–112.

↓ V

- ↓ Vessoni Penna, T. C., Jozala, A. F., Novaes, L. C. L., Pessoa Jr., A., and Cholewa, O. 2005. Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. Applied Biochemistry and Biotechnology, 121-124, 619-637.

ANNEXE I

LES MILIEUX DE CULTURES

• **Milieu MRS (Mac-Rogosa Sharpe)**

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
D (+) Glucose	20g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0,1g
MnSO ₄	0,05g
Agar	12g
Tween 80	1ml
Eau distillée	1000ml
pH	6,5 ± 0,2

Autoclavage à 121°C pendant 15 min.

• **Gélose nutritive (GN)**

Peptone	15g
Extrait de levure	3g
D (+) Glucose	1g
NaCl	6g
Agar	23g

Eau distillée	1000ml
pH	7,5 ± 0,2

Autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Milieu Mac Conkey**

Peptone de caséine	17g
Peptone	3g
Lactose	10g
Mélange de sel biliaire	1,5g
Chlorure de sodium	5g
Rouge neutre	0,03g
Cristal violet	0,001g
Agar - Agar	13,5g
Eau distillée	1000ml
pH	7,1

Autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Annexe II

Tableau : Zones d'inhibition formées (en mm) dans un milieu contenant deux enzymes protéolytiques

BP \ BL	<i>E.coli</i>			<i>Staphylocoque</i>			<i>Klebsiella</i>			<i>Listeria</i>			<i>Enterobacter</i>			<i>Pseudomonas</i>			<i>Salmonella</i>			<i>B.cereus (R)</i>			<i>B.cereus (C)</i>		
	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe	Ab	Pr	Pe
Lclj3	30	15	16	23	17	18	22	20	18	25	12	17	24	21	11	20	15	16	21	18	18	23	16	18	27	20	21
Lclj4	27	19	15	29	26	21	28	13	20	21	16	16	26	17	21	19	19	23	35	21	18	28	15	17	24	30	27
Lcdj1	30	30	14	24	14	29	26	17	27	27	15	21	33	23	22	39	21	35	29	18	23	29	18	21	26	30	21
Lcdj2	31	15	19	21	19	18	22	20	24	22	21	19	24	22	21	23	21	25	23	19	21	22	17	18	29	26	30
Lcdj3	27	00	00	24	00	00	23	00	00	18	00	00	21	00	00	17	00	00	18	00	00	20	00	00	30	15	18

BL: bactéries lactiques.

BP: bactéries pathogènes

Ab : absence d'enzyme.

Pr : protéinase

Pe : pepsine.

Tableau : Zones d'inhibition formées (en mm) en présence et absence de catalase

BP \ BL	<i>E.coli</i>		<i>Staphylocoque</i>		<i>Klebsiella</i>		<i>Listeria</i>		<i>Enterobacter</i>		<i>Pseudomonas</i>		<i>Salmonella</i>		<i>B.cereus (R)</i>		<i>B.cereus (C)</i>	
	MSC	MC	MSC	MC	MSC	MC	MSC	MC	MSC	MC	MSC	MC	MSC	MC	MSC	MC	MSC	MC
Lclj3	30	30	23	36	22	20	25	25	24	22	20	00	21	22	23	19	27	32
Lclj4	27	26	29	39	28	25	21	22	26	32	19	00	35	26	28	26	24	33
Lcdj1	30	34	24	42	26	31	27	29	33	29	39	00	29	23	29	31	26	37
Lcdj2	31	25	21	29	22	19	22	20	24	20	23	00	23	26	22	20	29	38
Lcdj3	27	20	24	36	23	20	18	22	21	19	17	00	18	21	20	21	30	22

BL : bactéries lactiques. BP : bactéries pathogènes.

MSC : milieu sans catalase. MC : milieu avec catalase.