

MAST-800-259 /

République Algérienne Démocratique Et Populaire <sup>01</sup>

Université ABOU BEKR BELKAID - TLEMCEM

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

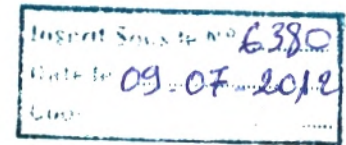
Département de Biologie

Laboratoire L.A.M.A.A.B.E

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master de Biologie  
Moléculaire et Cellulaire

Option

Microbiologie



**THEME**

Recherche des substances antibactériennes produites par une souche  
lactique (S98) appartenant à la sous espèce *Lactococcus lactis subsp lactis*  
*biovar diacetylactis*

Présenté par :

M<sup>lle</sup> Hadj-Mimoune Sarra



Devant le jury :

M<sup>r</sup> Abdelouahed .D : Professeur

D<sup>r</sup> Rebiahi .S : Maitre de conférences de classe B

M<sup>me</sup> Bensalah .F.Z : Maitre assistante de classe A

M<sup>me</sup> Bendimerad .N : Maitre assistante de classe A

Président

Examinateur

Examinatrice

Promotrice

Année Universitaire : 2011-2012

## *Remerciement*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma promotrice M<sup>me</sup> BENDIMERAD .N. Maitre assistante classe A pour avoir accepté d'encadrer ce travail, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.*

*Je tiens à exprimer ma grande considération et mes sentiments de reconnaissance aux :*

*PR ABDELOUAHED .D pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury.*

*D<sup>r</sup> REBIAHI .S Maitre de conférence de classe B d'avoir accepté d'examiner ce travail*

*M<sup>me</sup> BENSALAH .F.Z Maitre assistante de classe A d'avoir accepté d'examiner ce travail*

*Très nombreux sont les gents qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail, tout en nous excusant auprès d'eux de ne pas citer, nous leur exprime nos vives reconnaissance.*



## *Dédicaces*

*Je rends grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis. Amen.*

*Je dédie ce travail à  
Mon père*

*Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours, que Dieu te donne santé et longue vie.*

*Ma mère*

*Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ton aide précieuse et toutes ces années de compréhension.*

*A tous les membres de la famille **Hadj-Mimoune** : frères, sœurs, grand mère, grand père, tantes, tontons, cousines et cousins. A cette occasion, je voudrais exprime toute ma reconnaissance à mes frères : Amine , Fahed et Alaa Edinne et ma sœur : Manel.*

*Je clos ces remerciements en dédiant ce travail au peu d'amies que eus la chance d'avoir à mes cotés, qui m'ont soutenue tout au long de cette année en particulier : Zahira, Amina, Amel, Batoul, Khawla et Zohra.*

*A toute la promotion du 2<sup>ème</sup> année Master Microbiologie.*



## Résumé :

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bio conservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autre substance antibactériennes telles que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes.

Dans ce contexte ce travail consiste à étudier l'effet inhibiteur de la souche lactique S98 appartenant au genre *Lactococcus* et de l'espèce *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* vis à vis de cinq souches pathogènes par la méthode de Fleming et *al.*, 1985.

Les résultats obtenus ont montré que la souche S98 possède un effet antagoniste en produisant l'acide qui agit totalement sur *E coli* et *Listeria* et des bactériocines de nature lipoprotéique ou glycoprotéique ainsi que d'autres facteurs inhibiteurs. Ces substances ont un effet bactériostatique sur les bactéries pathogènes testées.

L'interaction entre bactéries pathogènes et bactérie lactique montre un pouvoir inhibiteur de *Listeria* à 48h et d'*Enterococcus* à 96h par S98.

**Mots clés :** antagonisme, bactériocines, bactérie lactique, bactéries pathogènes, *Lactococcus lactis* , acide lactique.

## **Abstract:**

Lactic acid bacteria used in the fermentation and the bio preservation of food thanks to the production of organic acids and of other substance antibacterial such as bacteriocins by inhibiting certain pathogenic strain.

In the context this work is to study the inhibitory effect of lactic strain belonging to the genus *Lactococcus* and the species *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* against five pathogenic strains, by using the method of Fleming and *al.*, (1985).

Acquired results took up that the strain S98 has an effect antagonism by producing the acid which acts completely on *E coli* and *Listeria* and bacteriocins of nature lipoprotéique or glycoprotéique as well as of other inhibitive factors. These substances have a bactériostatic effect on the tested pathogenic bacteria.

The correlation between pathogenic bacteria and lactic acid bacteria shows an inhibitive power of *Listeria* at 48 h and *Enterococcus* at 96 h by S98.

**Clées words:** antagonism, lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, *Lactococcus lactis*, lactic acid

## Table de Matière

Introduction.....	01
<b>Partie 1 : Synthèse Bibliographique</b>	
<b>CHAPITRE I : Bactéries lactiques.....</b>	<b>02</b>
I.1. Définition.....	02
I.2. Caractères généraux.....	02
I.3. Habitat.....	02
I.4. Classification des bactéries lactiques.....	02
I.5. Genre <i>Lactococcus</i> .....	04
I.5.1. Définition.....	04
I.5.2. Habitat.....	05
I.5.3. Taxonomie.....	05
II.4. Rôle de <i>Lactococcus</i> .....	05
I.6. Métabolisme des bactéries lactiques.....	06
I.6.1. Métabolisme des sucres.....	06
I.6.1.1. Voie homofermentaire ou EMP.....	06
I.6.1.2. Voie hétérofermentaire ou PPC (pentose phosphocétolase).....	06
I.7. Application de l'activité des bactéries lactiques.....	07
I.7.1. Pouvoir technologique.....	07
I.7.1.1. Activité acidifiante.....	07
I.7.1.2. Production de composants d'arômes.....	08
I.7.1.3. Activité protéolytique.....	09
I.7.1.4. Résistance aux bactériophages.....	09
I.7.1.5. Résistance aux antibiotiques.....	09
I.7.2. Utilisations industrielles des bactéries lactiques.....	09
I.7.3. Intérêt des bactéries lactiques sur la santé humaine.....	11
<b>CHAPITRE II : Interactions.....</b>	<b>12</b>
II.1. Définition.....	12
II.2. Différents types d'interactions.....	12
II.2.1. Les interactions directes.....	12
II.2.1.1. La prédation et le parasitisme.....	12
II.2.2. Les interactions indirectes.....	12
II.2.2.1. Le neutralisme.....	12



II.2.2.2. Le commensalisme.....	13
II.2.2.3. La compétition.....	13
II.2.2.4. L'amensalisme (antagoniste).....	13
II.3. L'antagoniste des bactéries lactiques.....	13
II.3.1. Inhibiteurs non spécifique.....	14
II.3.1.1. L'acides organiques.....	14
II.3.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	14
II.3.1.3. Les phages lactiques.....	14
II.3.1.4. Le dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ).....	14
II.3.1.5. Le diacétyl.....	14
II.3.1.6. La reutérine.....	15
II.3.2. Inhibiteurs spécifique.....	15
II.3.2.1. Les bactériocines.....	15
II.3.2.1.1. Classification des bactériocines.....	15
II.3.2.1.1.1. Classe I : Les lantibiotiques.....	15
II.3.2.1.1.2. Classe II.....	16
II.3.2.1.1.3. Classe III.....	16
II.3.2.1.1.4. Classe IV.....	17
<b>CHAPITRE III : Bactéries pathogène et d'altérations.....</b>	<b>18</b>
III.1. Définition .....	18
III.2. <i>Salmonella</i> .....	18
III.3. <i>Escherichia</i> .....	19
III.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
III.5. <i>Bacillus cereus</i> .....	21
III.6. <i>Enterococcus</i> .....	22
III.7. <i>Listeria</i> .....	23
<b>Partie 2 : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>24</b>
I. Souches étudiées.....	24
I.1. Souche lactique.....	24
I.2. Bactéries pathogènes .....	24
I.3. Préparation des souches .....	24
II. Détection de l'effet antagonisme par la bactérie lactique.....	25
III. Recherche des agents inhibiteurs.....	26
III.1. Facteur acidité .....	26

III.2. Facteur bactériocines .....	26
IV. Nature de l'effet inhibiteur.....	27
IV.1. Premier procédé.....	27
IV.2. Second procédé.....	27
V. Durée de vie d'une bactérie nuisible en interaction avec une bactérie pathogène.....	27
V.1. Préparation du lait écrémé.....	27
V.2. Ensemencement des souches.....	27
<b>Partie 3 : Résultats et Interprétations.....</b>	<b>30</b>
I. Détection de l'effet antagonisme par la bactérie lactique.....	30
II. Recherche des agents inhibiteurs.....	31
II.1. Facteur acide.....	31
II.2. Facteur bactériocine.....	32
III. Nature de l'effet inhibiteur.....	33
IV. Durée de vie d'une bactérie lactique en interaction avec une bactérie pathogène.....	34
<b>Partie 4 : Discussion .....</b>	<b>35</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>37</b>
<b>Référence bibliographie.....</b>	<b>38</b>
<b>Annexes 1 .....</b>	<b>44</b>
<b>Annexes 2 .....</b>	<b>47</b>



## Liste de Figure

<b>Figure 01 :</b> Principales voies du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques.....	07
<b>Figure 02 :</b> Séquence et structure de lantibiotiques .....	16
<b>Figure 03 :</b> Salmonella après coloration Gram (microscopie électronique).....	18
<b>Figure 04 :</b> <i>Eschérichia coli</i> (coloration Gram).....	19
<b>Figure 05 :</b> <i>Eschéricha coli</i> (micrographe électronique).....	19
<b>Figure 06 :</b> <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
<b>Figure 07 :</b> <i>Bacillus careus</i> .....	21
<b>Figure 08 :</b> <i>Enterococcus faecalis</i> .....	22
<b>Figure 09 :</b> <i>Listeria monocytogeneses</i> .....	23
<b>Figure 10 :</b> Détection de l'effet antagonisme par la bactérie lactique (Méthode de Fleming et al., 1985).....	25
<b>Figure 11 :</b> Durée de vie d'une souche pathogène avec S98 ensemencées en interaction dans le lait écrémé.....	29
<b>Figure 12 :</b> Zones d'inhibitions formées par l'effet antagonisme de S98.....	30
<b>Figure 13 :</b> Zones d'inhibitions formées par l'effet antagonisme deS98.....	30
<b>Figure 14 :</b> Zones d'inhibitions formées par S98 en milieu neutralisé et non neutralisé.....	31
<b>Figure 15 :</b> Zones d'inhibitions formées par S98 en milieu Tamponné et non Tamponné.....	31
<b>Figure 16 :</b> Zones d'inhibitions formées par S98 en présence et en absence de pepsine.....	32
<b>Figure 17 :</b> Zones d'inhibitions formées par S98 en présence et en absence de pepsine.....	32
<b>Figure 18 :</b> Effet bactériostatique de la souche S98.....	33
<b>Figure 19 :</b> Croissance de la souche S98 ensemencée en interaction avec <i>Listeria</i> et <i>Enterococcus</i> dans le lait écrémé.....	34

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01 :</b> Différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques....	04
<b>Tableau 02 :</b> Utilisation des bactéries lactiques dans l'alimentaire et exemples des espèces utilisées prédominantes.....	10
<b>Tableau 03 :</b> Codes et origine des souches pathogènes et d'altérations.....	24

## Liste des Abréviations

**C°** : degrés Celsius

**BN** : bouillon nutritif

**BL** : bactérie lactique

**BP** : bactérie pathogène

**B M17** : bouillon M17

**GN** : gélose nutritive

**G M17** : gélose M17

**ml** : millilitre

**mg** : milligramme

**t** : tour

**min** : minute

**g** : gramme

**h** : heure

**%** : pourcentage

# INTRODUCTION

La contamination des aliments est un problème majeur pour le consommateur surtout durant la période estivale dans les pays méditerranéens [Mami et al., 2010].

Depuis une époque immémoriale, l'homme a mis à profit les principes de fermentation afin de conserver ses aliments qu'ils soient à base de lait, de viande, de fruits ou de légumes [Leveau et al., 1993].

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes pour assurer la salubrité des aliments et pour lutter contre les microorganismes indésirables. La pasteurisation, la fermentation et la réfrigération ne constituent pas une garantie suffisante pour lutter contre la contamination microbienne [Cocolin et al., 2007].

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre important d'aliments. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons [EUFIC., 2002].

La fermentation permet de mieux les conserver. Si cette pratique était à l'origine intuitive, ses bases scientifiques sont aujourd'hui mieux comprises. L'évolution des connaissances conduit à la sélection et au développement de nouvelles souches de bactéries lactiques aux propriétés spécifiques [Ouhssine et al., 2005].

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques [Dortu et al., 2009].

Tel est l'objectif de cette étude qui consiste à rechercher si S98 une bactérie lactique appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* peut être utilisée comme conservatrice de produits alimentaires ; Pour cela ce travail est assuré à étudier l'effet antagoniste de S98 vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altération. Il permet d'étudier et recherche de nature de substances antimicrobiennes produites par *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* qui peuvent être des acides et/ou des bactériocines.



*PARTIE I:*  
*LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE*

## CHAPITRE I : Bactéries lactiques

### I.1. Définition

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (requièrent des molécules organiques complexes comme source énergétique) [Stiles et al., 1997].

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme [Stiles et al., 1997].

### I.2. caractères généraux

Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant en utilisant des sucres fermentescibles de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.) [Raynaud., 2006].

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes dont les caractéristiques sont les suivantes : bacilles ou coques Gram positif, asporulant, généralement immobiles, anaérobies mais aérotolérantes et ne possédant ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome oxydase. [Stiles et al., 1997]. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles [Gonzalez et al., 2000].

### I.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques [Douault et al., 2000]. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale [Stiles et al., 1997]. Elle ont été également retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout [Holzapfel et al., 1997].

### I.4. Classification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par une constellation de caractéristiques morphologiques, métaboliques, et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des Firmicutes, à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales* [Garrity et al.,

2001]. Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* des bactéries Gram-positif (G+C < 50mol%). Traditionnellement le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > 50mol % et affecté au phylum des *Actinomyces*. Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal [**Klein et al ., 1998**].

Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cela se traduit par l'existence au sein des espèces de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes [**Rizk ., 2006**].

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : [**Hughenoltz et al ., 1999**].



**Tableau 01:** Différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques. [Dortu et al., 2009 ; Yao., 2009]

Genre	Morphologie	Fermentation	T° optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	bacilles	Homo/hétéro-fermentaire	Thermo/mésophile	GI :23, GII :16, GIII :22
<i>Carnobacterium</i>	bacilles	Hétérofermentaire	Psychrophile	6
<i>Lactococcus</i>	coques	Homofermentaire	Mésophile	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	Méso/thermophile	19
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	Mésophile	13
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaire	Mésophile	2
<i>Pediococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaire	Mésophile	2
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaire	Mésophile	7
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophile	9
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophile	1
<i>Bifidobacterium</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophile	1
<i>Weissella</i>	Bacilles, coccobacilles ou coques ovoïdes	Hétérofermentaire stricte	Psychrotrophe	6
<i>Aerococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophile	7

## I.5. Genre *Lactococcus*

### I.5.1. Définition

Le genre *Lactococcus* était apparenté aux familles des Streptocoques. Il s'agit donc de bactéries à Gram positif dont les cellules en forme de coques sont associées par paires ou en chainettes de longueurs variable. Ces bactéries sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes).

Elles présentent un métabolisme homolactique, aucune activité  $\beta$ -hémolytique, et sont mésophiles puisque leur température optimale de croissance est proche de 30°C [Raynaud ., 2006 ; Djidel ., 2007].

### 1.5.2. Habitat

L'habitat le plus important des Lactocoques demeurent le lait, les laits fermentés ainsi que les fromages où ils constituent la flore dominante. Cependant, on peut également les isoler des plantes, ainsi que de la peau de certains animaux, et il semble que la contamination qui a lieu au cours de la traite ait pour origine principale le fourrage [Sandine et al ., 1972].

### 1.5.3. Taxonomie

Le genre *Lactococcus* inclut différentes espèces, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus raffinolactis*. L'espèce *Lactococcus lactis* regroupe elle-même trois sous-espèces, *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Lactococcus lactis subsp hordniae* et *Lactococcus lactis subsp lactis* qui elle-même comprend le *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*, capable de surproduire le diacétyle [Raynaud ., 2006].

Les différentes sous-espèces de *Lactococcus lactis* peuvent être différenciées entre autre par leur résistance aux stress. Ainsi, la sous-espèce *Lactococcus lactis subsp lactis* est plus robuste que la *Lactococcus lactis subsp cremoris* puis qu'elle est capable de croître à 40°C, ou en présence de 4 % de NaCl. De plus, la sous-espèce *lactis* est capable de produire de l'ammoniac à partir d'arginine qui est très rare chez *Lactococcus lactis subsp cremoris* [Raynaud ., 2006].

### 1.5.4. Rôle de *Lactococcus*

Les *lactococcus* jouent un rôle irremplaçable en contribuant à la structure et au goût, et en assurant la conservation et la salubrité des produit [Doleyre ., 2003].

*Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Lactococcus lactis subsp hordniae* et *Lactococcus lactis subsp lactis* modifient les qualités organoleptiques du lait, se sont deux agents « d'affinage ou d'altération » suivant l'appréciation humaine des conséquences qu'ils ont sur le lait [Leveau et al ., 1993].

## **I.6. Métabolisme des bactéries lactiques**

### **I.6.1. Métabolisme des sucres**

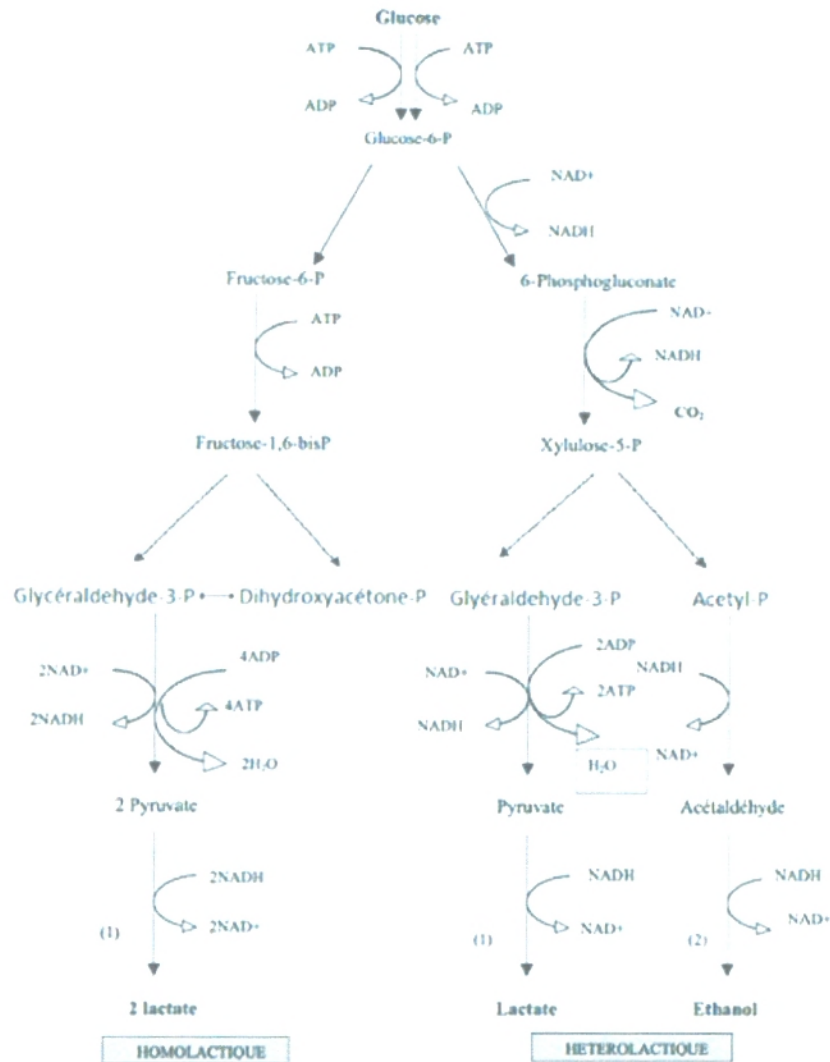
Les bactéries lactiques sont divisées en deux principaux groupes : Homofermentaires ou hétérofermentaires selon la nature, et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation des sucres [Djidel ., 2007].

#### **I.6.1.1. Voie homofermentaire ou EMP**

Les bactéries lactiques homofermentaires, comprenant des espèces de Streptocoques, Entérocoques, Lactocoques, Pediocoques et certains Lactobacilles convertissent presque quantitativement le glucose en excès en acide lactique (90-95%) [Djidel ., 2007].

#### **I.6.1.2. Voie hétérofermentaire ou PPC (pentose phosphocétolase)**

La fermentation hétérolactique doit sa dénomination au fait qu'en dehors du lactate, elle aboutit à la formation d'éthanol, de CO<sub>2</sub> et éventuellement d'acétate [Djidel ., 2007].



**Figure 01:** Principales voies du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques : P, phosphate ; ADP, adenosine 5'-diphosphate ; ATP, adénosine 5'-triphosphate ; NAD<sup>+</sup>, lactate déshydrogénase ; (2), alcool déshydrogénase [Wee et al ., 2006].

## I.7. Application de l'activité des bactéries lactiques

### I.7.1. Pouvoir technologique

#### I.7.1.1. Activité acidifiante

Les bactéries lactiques se caractérisent par la production d'acide lactique et l'abaissement du pH, provoquant une déstabilisation de la dispersion micellaire ce qui rend le lait de moins en moins stable aux traitements thermiques et peut entraîner sa coagulation même à température ambiante [FAO ., 2007].

L'acidification est le rôle principal des bactéries utilisée comme ferments, celle-ci à différents buts :

- ✓ La coagulation du lait (en facilitant l'action de l'enzyme de la présure) et l'augmentation de la synthèse du caillé.
- ✓ La participation aux propriétés rhéologiques du produit final.
- ✓ L'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles [Cécile ., 1998].

#### **1.7.1.2. Production de composants d'arômes**

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des produits fermentés [Cécile ., 1998]. La plupart des composés d'arômes sont issus du métabolisme du citrate et du lactose. Les composants d'arômes produits directement sont le diacétyl, l'acétaldéhyde, l'éthanol, et quelques autres alcools et acides organiques [Eck et al ., 1997] dont l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants [Weber et al ., 1986].

#### **1.7.1.3. Activité protéolytique**

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Ceux-ci peuvent être transformés en alcool et en acide, cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final [Weber et al ., 1986].

#### **1.7.1.4. Résistance aux bactériophages**

Les phages, virus des bactéries, sont des parasites obligatoires, ils constituent l'une des principales causes de perturbation de l'acidification du lait par les bactéries lactiques. Il est nécessaire que les bactéries lactiques composant les ferments ne soient pas toutes sensibles aux mêmes phages pour diminuer les risques d'accidents de fabrication [Cecile ., 1998].

#### **1.7.1.5. Résistance aux antibiotiques**

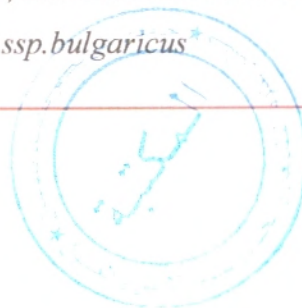
La présence d'antibiotiques dans les laits (Pénicilline, Vancomycine...) peut être due au traitement des mammites. La plupart des bactéries y sont sensibles mais, de plus en plus l'émergence de souches résistantes à ces antibiotiques aura lieu surtout dans le genre *Enterococcus* [Aguirre et al ., 1993].

### 1.7.2. Utilisations industrielles des bactéries lactiques

La fermentation lactique des aliments constitue l'une des plus anciennes formes de conservation de la nourriture. Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourts et fromages). Ces bactéries interviennent également dans la fabrication des salaisons, du vin et des ensilages. Enfin elles ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (texture et arôme par exemple) (**Tab : 02**). L'action de la flore lactique sur la conservation d'un aliment est liée à l'abaissement du pH consécutif et à la production d'acide lactique. [Moll *et al.*, 19999].

**Tableau 02** : Utilisation des bactéries lactiques dans l'alimentaire et exemples des espèces utilisées prédominantes [McKay et al., 1990].

Applications	Espèces utilisées
<b>Fermentation de végétaux</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus</i>
<b>Fermentation de viandes et poissons</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
<b>Boissons alcoolisées</b>	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<b>Café et cacao</b>	Bactéries lactiques variées
<b>Sauce de soja</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Pediococcus soyae</i>
<b>Aliments fermentés indigènes</b>	Bactéries lactiques variées
<b>Ensilage</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b>Probiotiques</b>	<i>Lactobacillus acidobacillus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
<b>Pain au levain</b>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus leichmanii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
<b>Biscuits</b>	
<b>Produits laitiers fermentés</b>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>



### I.7.3. Intérêt des bactéries lactiques sur la santé humaine

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907, par le russe Metchnikoff. Plus récemment, des études de type pharmaceutique ont été menées à grande échelle.

Les bactéries lactiques comptent parmi les principaux probiotiques ; elles comprennent, notamment : les Lactobacilles, les Bifidobactéries, et les Streptocoques (genre *Streptococcus*) [Lefrançois et al ., 2006].

Des études ont montré l'intérêt des probiotiques pour : [Levesque ., 2007]

- ✓ Réduire la durée des diarrhées
- ✓ Prévenir « la tourisa » diarrhée des voyageurs
- ✓ Stimuler le système immunitaire
- ✓ Soutenir un impact positif pour les graisses circulantes
- ✓ Prévenir l'eczéma atypique chez les enfants à risque [Lefrançois ., 2006]
- ✓ Réduire le taux de cholestérol [Hlivak et al ., 2005].



## CHAPITRE II : Interactions

### II.1. Définition

Dans toute niche écologique où des microorganismes sont en compétition, ceux dont la capacité d'assimilation des substrats est grande ou dont la résistance à un facteur environnemental donné est meilleure possèdent un avantage certain. Cet avantage peut être toutefois grandement amélioré lorsque les microorganismes en question produisent des substances antimicrobiennes telles que des bactériocines, des antibiotiques, des toxines, des enzymes bactériolytiques, des bactériophages, ou d'autres sous-produits du métabolisme tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et le diacétyl [Izquierdo Alegre *et al.*, 2009].

### II.2. Différents types d'interactions

Il existe deux types d'interaction :

#### II.2.1. Les interactions directes

Elles comprennent :

##### II.2.1.1. La prédation et le parasitisme

L'une des espèces vit totalement au dépend de l'autre. La victime devient un substrat et est totalement digérée dans le cas de la prédation ou bien une partie de ses tissus est consommée comme dans le cas du parasitisme. Ainsi les bactéries peuvent être parasitées par des virus (bactériophages), comme le phage [Arendt *et al.*, 1991].

#### II.2.2. Les interactions indirectes

Sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent :

##### II.2.2.1. Le neutralisme

On distingue deux phénomènes

- ✓ le mutualisme (symbiose) Aucun changement dans la croissance des populations n'a lieu ; la présence d'une population n'affecte pas l'autre. Ceci définit en fait l'absence d'interaction. Ce type de relation n'est possible que si aucun des substrats n'est limitant ou si les espèces ont des besoins nutritionnels totalement différents [Nehme *et al.*, 2008].
  
- ✓ le synergisme (proto-coopération) Durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la

proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement [Nehme ., 2008].

#### II.2.2.2. Le commensalisme

Est une relation dans laquelle un organisme, le commensal tire un avantage alors que l'autre, l'hôte, n'est ni affecté ni aidé. Il s'agit d'un processus unidirectionnel. Souvent, l'hôte et le commensal « mangent à la même table » [Prescott et al ., 2003].

#### II.2.2.3. La compétition

Dans le cas de la compétition, les deux populations se développent sur le même substrat et consomment toutes les deux un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance et celle dont la vitesse de croissance est la plus affectée sera la plus désavantagée [Lonvaud-Funel et al ., 1988].

#### II.2.2.4. L'amensalisme (antagoniste)

Une des populations produit une substance ayant un effet négatif sur la croissance de l'autre. Cette situation est semblable à la compétition par interférence, exceptée que dans l'amensalisme une des populations n'est pas affectée par l'interaction. Le cas typique d'amensalisme chez les levures est la toxine « killer » produite par certaines souches de *S. cerevisiae* et qui entraîne la mort des souches sensibles [Ramon-Portugal et al ., 1994].

### II.3. L'antagoniste des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques [Dortu et al ., 2009]. Ces facteurs sont : dans les inhibiteurs spécifiques et non spécifiques

### II.3.1. Inhibiteurs non spécifique

#### II.3.1.1. Les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques [Liu ., 2003], qui diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe [ Brul et al ., 1999].

Leur compétitivité est améliorée étant donné leur grande tolérance aux pH bas extra et intra cellulaires. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée [Janssen et al ., 2007].

#### II.3.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène. Leur l'effet antimicrobien résulte de la peroxydation des lipides membranaires ainsi que de la perméabilité de la membrane [Kong et al ., 1980]. Il a été montré que la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par des souches de *Lactobacillus* ou *Lactococcus* inhibait *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp* et d'autres microorganismes psychrotrophes dans les aliments [Ammor ., 2004].

#### II.3.1.3. Les phages lactiques

Chez la flore lactique la lysogènes a été suspecté depuis longtemps, elle a été d'abord mise en évidence par des observations de lyse et la présence des phages en microscope. [Kozak et al ., 1978].

#### II.3.1.4. Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation du dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité [Ammor et al ., 2006].

#### II.3.1.5. Le diacétyle

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyle (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont

dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles [El Ziney et al., 1998]. Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (2 à 7 ppm) [Caplice et al., 1999].

#### II.3.1.6. La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite par certaines espèces comme *Lactobacillus* [El-Ziney et al., 1998]

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

### II.3.2. Inhibiteurs spécifique

#### II.3.2.1. Les bactériocines

Les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action [Klaenhammer., 1988].

Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram-positives [Dortu., 2008].

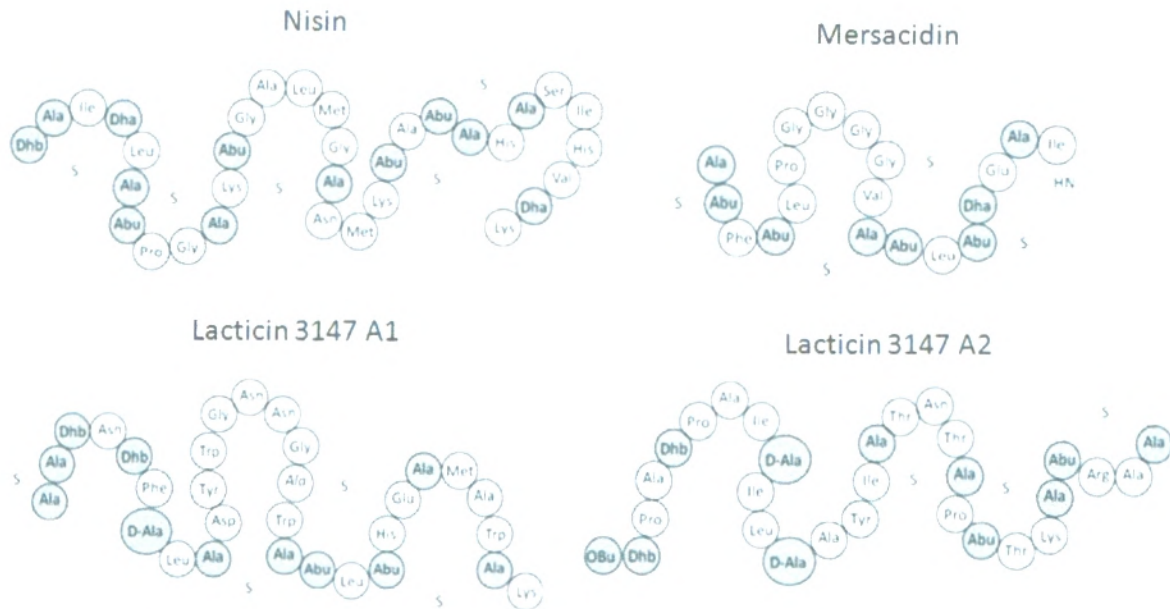
##### II.3.2.1.1. Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993) [Dortu., 2008].

###### II.3.2.1.1.1. Classe I : Les lantibiotiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5kDa qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement c'est à dire la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils sont stables à la chaleur. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui contient des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant

jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui contient les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés [Twomey et al., 2002].



**Figure 03 :** Séquence et structure de l'antibiotiques de type A (nisin) et B (mersacidin) et de « two-peptides lantibiotic » (lacticin 3147 A1 et A2) [Dortu., 2008].

Parmi les bactériocines de classe I, la nisine est la plus anciennement connue et la seule légalement autorisée comme additif en alimentation humaine [Moretro et al., 2005].

### II.3.2.1.1.2. Classe II

Peptides de taille inférieure à 10kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés et chargés positivement à un pH neutre [Richard et al., 2006].

### II.3.2.1.1.3. Classe III

Elle contient les protéines de taille supérieure à 30kDa 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 contient les quatre bactériocines suivantes : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* [Nigutova et al., 2007].

#### III.2.1.1.4. Classe IV

Elle contient les peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. [Dortu ., 2008].



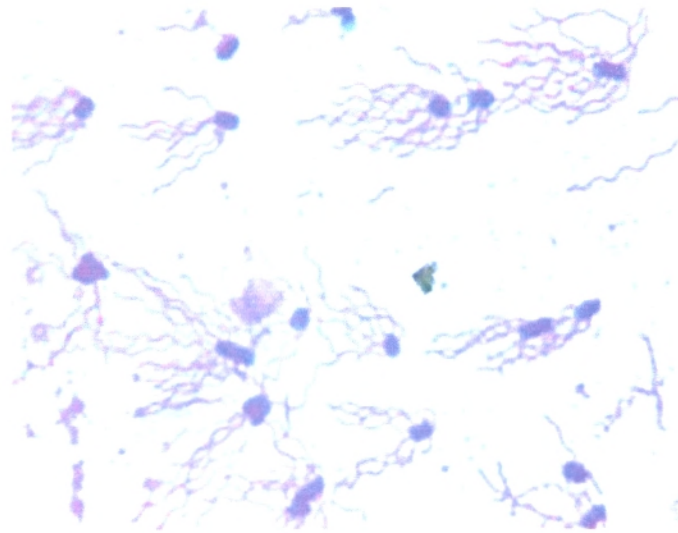
## CHAPITRE III: Bactéries pathogènes et d'altérations

### III.1. Définition

Les microorganismes pathogènes sont des microorganismes pour la plus part ubiquitaires qui peuvent être responsables de toxi-infection ou d'intoxication alimentaire (intoxication sans infection) [Alomar ., 2007].

### III.2. *Salmonella*

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives, capables de se multiplier à des températures comprises entre 5 et 45°C et à des valeurs de pH de 4.5 à 9. Elles sont à l'origine de salmonellose qui est l'une des toxi-infections alimentaires les plus courantes et les plus répandues [Alomar ., 2007].



**Figure 04 :** Salmonella après coloration Gram (microscopie électronique). De nombreux flagelles couvrant les bactéries [Kaiser ., 1998].

### III.3. *Escherichia coli*

C'est un bacille Gram- anaérobie facultative possédant des flagelles de nature péritriches. [Philipon ., 2004].

*E.coli* est une bactérie normalement présente parmi la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales, y vivant en commensal. A ce titre, elle est recherchée dans les aliments comme indicateur de contamination fécale : sa présence est un marqueur de l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries d'origine digestive qui pourraient être pathogène [Kaper et al ., 2004].

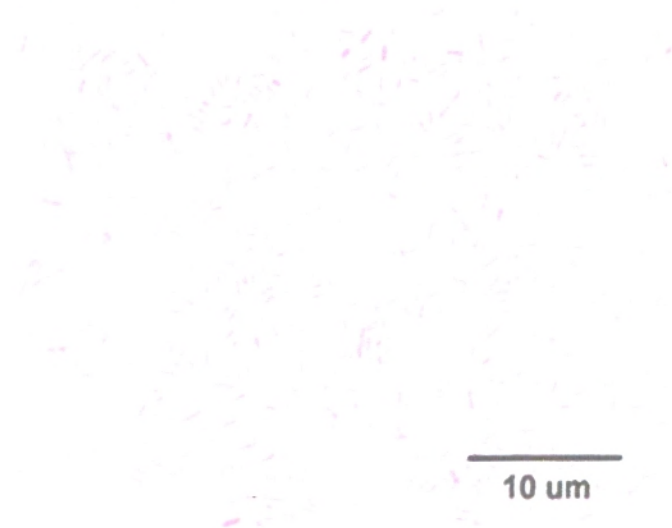


Figure 05 : *Eschérichia. coli* (coloration Gram) [kaiser ., 1998]

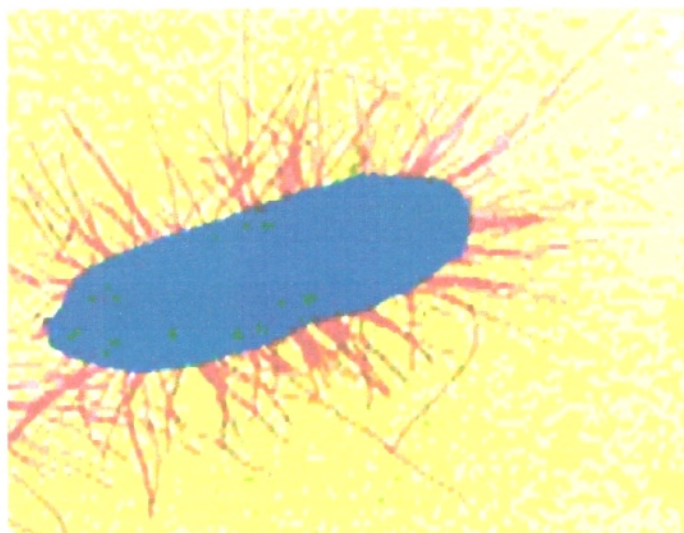
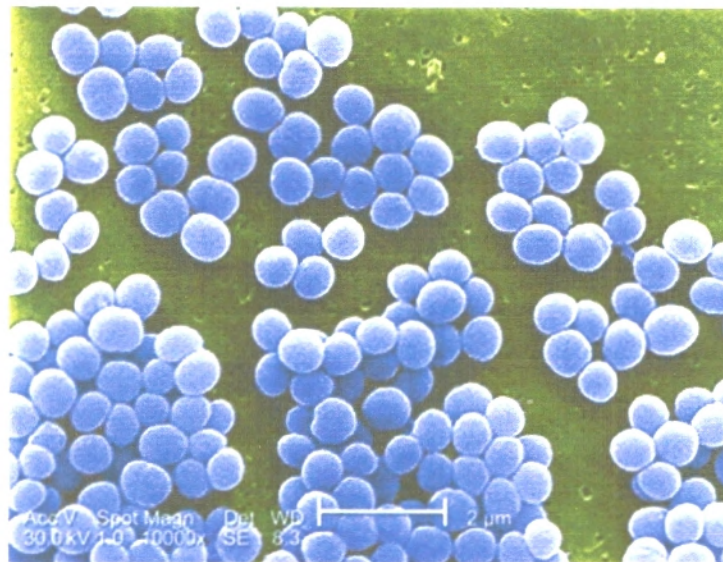


Figure 06 : *Eschéricha.coli* (micrographie électronique) [Kaiser ., 1998]



### III.4. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est l'espèce de staphylocoque la plus pathogène aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Elle est staphylocoque est non-motile et se présente en coques de 0,5 à 1,5 µm de diamètre associés en paires ou en grappes [Sutra et al ., 1998].



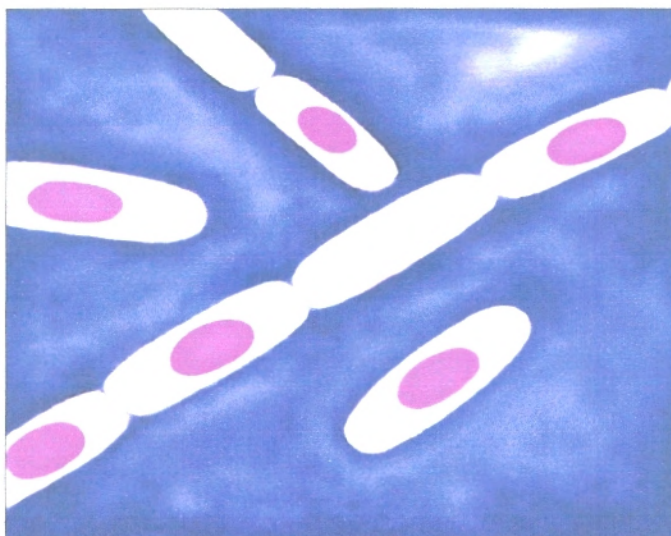
**Figure 07 :** *Staphylococcus aureus* observé en microscopie électronique à balayage (10000X)  
<http://www.extension.org/pages/28432/staphylococcus-aureus>

C'est une bactérie anaérobie facultative et elle est également mésophile, ayant une température optimale de croissance à 37 °C. Sa tolérance à des grands intervalles de température, de pH et aux concentrations élevées de chlorure de sodium (jusqu'à 20 %) la diffère des autres bactéries et favorise sa croissance et sa propagation dans plusieurs milieux et environnements [Adams et al ., 2008].

### III.5. *Bacillus cereus*

Le genre *Bacillus* est constitué de bactéries sporulées et telluriques. La plupart de ces bactéries sont peu pathogènes pour l'homme, à deux exceptions près : *Bacillus anthracis*, qui est responsable du charbon, et *Bacillus cereus* qui est l'espèce la plus fréquemment isolée de produits pathologiques [Teyssou et al., 1998].

*Bacillus cereus* est un bacille à Gram positif, sporogone, aéro-anaérobie facultative et mobile par ciliature péritriche, poussant bien sur milieu ordinaire en 24 heures, possédant une cytochrome oxydase, une lécithinase et une gélatinase, très hémolytique et résistant à la pénicilline G [Teyssou et al., 1998].



**Figure 08 :** *Bacillus cereus*

[http://www.inra.fr/mica/infos\\_science/faits\\_marquants/2007/contrôle\\_de\\_l'expression\\_du\\_pouvoir\\_pathogène\\_chez\\_bacillus\\_cereus](http://www.inra.fr/mica/infos_science/faits_marquants/2007/contrôle_de_l'expression_du_pouvoir_pathogène_chez_bacillus_cereus)

### III.6. *Enterococcus*

Les *Enterococcus* sont des bactéries anaérobies, cocci à Gram<sup>+</sup>, se présentant sous forme de chainettes. Ce sont des pathogènes opportunistes causant des septicémies, infections urinaires, ou abdominales d'origine intestinale. Ils sont la cause de plus de 10% des infections nosocomiales [Klipper et al., 1984].

Pendant très longtemps, les Enterocoques ont été classés au sein du genre *Streptococcus*, jusqu'en 1984, où une analyse du génome indiqua qu'il était plus approprié de créer le genre *Enterococcus* [Klipper et al., 1984].

Les deux principales espèces sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ils sont assez résistants aux acides, ce qui leur permet de passer la barrière stomacale. Dans l'eau potable, ce sont des indicateurs de contamination fécale, comme les colibacilles [Klipper et al., 1984].

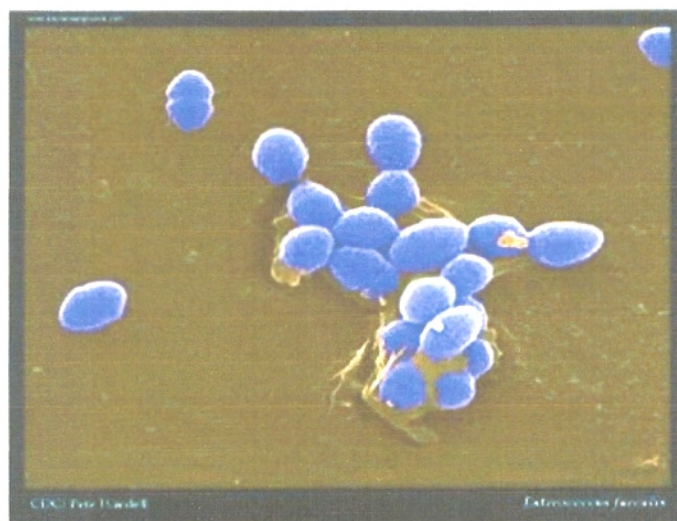


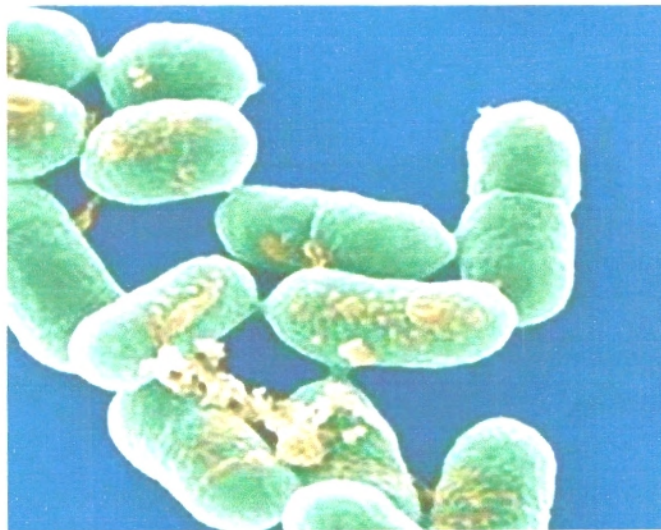
Figure 09 : *Enterococcus faecalis*

<http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20electron%20microscopy.html>

### III.7. *Listeria*

Ce sont des bacilles de petite taille à Gram<sup>+</sup>, non sporulé et non capsulé, aérobie-anaérobie facultative. Elles sont catalase positive et oxydase négative [Alomar ., 2007].

La seule espèce de *Listeria* qui soit pathogène pour l'homme et les animaux est *Listeria monocytogenes*, elle cause la listériose qui atteint préférentiellement les personnes dont le système immunitaire est déficient, les femmes enceintes, les nouveaux nés et les personnes âgées. *Listeria* peut survivre proliférer sur des aliments conservés au réfrigérateur. De plus, les aliments contaminés par *Listeria* ont une apparence, une odeur et un gout normaux [Vazquez-Boland et al 2001].



**Figure 10 :** *Listeria monocytogenes*

<http://pubs.ext.vt.edu/2910/2910-7033/2910-7033.html>

*Partie 2 :*  
*Matériels et Méthodes*



## I. Souches étudiées

### I.1. Souche lactique

La souche lactique S98 appartient au genre *Lactococcus*, à l'espèce *Lactococcus lactis* et à la sous espèce *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacety lactis* est une bactérie de la collection de souche du laboratoire de microbiologie LAMAABE, c'est-à-dire : Purifié et identifiées par PCR au cours des travaux antérieurs.

### I.2. Bactéries pathogènes

Elles appartiennent aux genres et espèces suivants :

**Tableau 03 : Codes et origine des souches pathogènes et d'altérations :**

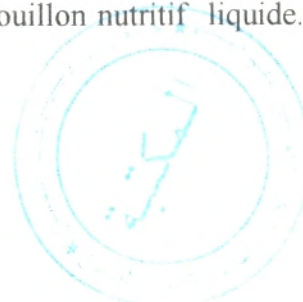
Bactéries pathogènes	Code	origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	Institut pasteur d'Alger
<i>Bacillus cereus</i>	Pas de référence	L.A.M.A.A.B.E
<i>Escherichia coli</i>	ATCCP25922	Institut pasteur d'Alger
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	Institut pasteur d'Alger
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19145	Institut pasteur d'Alger

### I.3. Préparation des souches

Pour réaliser le test d'antagonisme et rechercher les facteurs inhibiteurs. Les souches étudiés et testés sont revivifiées comme suit :

A partir d'un tubes Eppendorf de la souche lactique S98 qui était conservée à -20°C au congélateur, est revivifiée dans un tube à essai contenant 5 ml du bouillon M17 liquide, puis incubé à 30°C pendant 48h.

Chacune des cinq souches pathogènes sont revivifiées à partir des tubes inclinés de gélose nutritive dans un tube à essai contenant 5 ml du bouillon nutritif liquide. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.



## II. Détection de l'effet antagonisme par la bactérie lactique

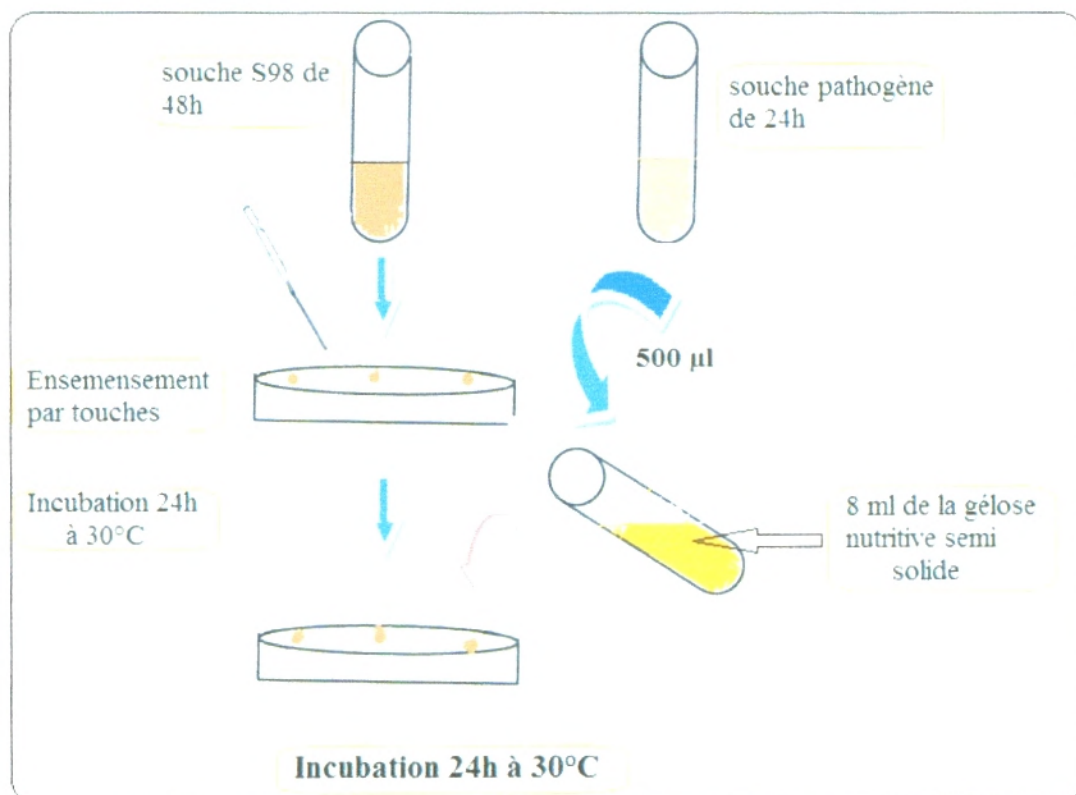
- **Méthode de la couche mince**

Elle consiste à ensemencer en profondeur 1ml de la culture lactique puis couler 15ml de la gélose M17 solide. Après 24h d'incubation à 30°C les bactéries pathogènes sont ensemencées en spots puis laisser sécher pendant 2 à 3h, les spots sont ensuite recouverts de 8ml de gélose semi solide M17 en surfusion. Après solidification, les boîtes de Pétrie sont incubées pendant 24h à 30°C.

- **Méthode de Fleming et al., 1985**

Elle consiste à ensemencer par touche la culture lactique de 48h à la surface du milieu M17 solide, après séchage pendant 30 mn à la température ambiante, les boîtes sont mises à l'étuve pendant 24h à 30°C.

Les spots sont ensuite recouverts de 8ml de gélose nutritive molle en surfusion contenant 500 µl d'une culture pathogène de 24h. Après solidification, les boîtes de Pétrie sont incubées pendant 24h à 30°C (Figure 10).



**Figure 10 :** Détection de l'effet antagonisme par la bactérie lactique  
(Méthode de Fleming et al., 1985)

### III. Recherche des agents inhibiteurs

Le genre *Lactococcus* agit par l'intermédiaire de certains de leur produit de métabolisme capable d'inhiber le développement des flores bactériennes d'altération et ou pathogènes. Ces agents antibactériens peuvent être soit l'acide lactique, des molécules de structures peptidiques appelées bactériocines, soit d'autres agents. Pour savoir si la souche S98 produit des acides et des bactériocines la méthode de Fleming et *al.*, (1985) est appliquée.

Pour cette raison, nous avons été amenés à déterminer la nature du facteur inhibiteur. Ainsi pour s'assurer de la présence de ces substances, un volume de 10ml d'une culture jeune de S98 est remplie dans des tubes à hémolyse à raison de 5ml puis centrifugés à 3000 tours / min pendant 30 min, le surnageant est récupéré.

#### III.1. Facteur acidité :

Le test est réalisé en appliquant la méthodes de Fleming et *al.*, (1985)

Le surnageant est ensemencé en touche sur une gélose M17 puis incubé à 30°C pendant 48h. Après incubation une gélose semi solide contenant 500 µl d'une culture pathogènes de 24h et coulé à la surface.

En parallèle des boites sont utilisé dont le surnageant est tamponné à pH = 6.7 avec NaOH 0.1N. Le tout est incubé à 37°C pendant 24h.

Les cultures sont ensuite recouvertes de 8ml de gélose molle, puis ensemencée avec 500 µl d'une culture pathogène de 24h. Après solidification, les boites de pétrie sont incubées pendant 24h à 30°C.

#### III.2. Facteur bactériocines :

Afin de vérifier s'il s'agit ou non de substances antibactériennes de type bactériocine. Une enzyme protéolytique est testée: **la pepsine.**

Le test est réalisé en appliquant la méthodes de Fleming et *al.*, (1985)

Le surnageant est neutralisé à pH = 6,7 pour éliminer l'effet des acides organiques puis ensemercer par touche à la surface du milieu M17 solide.

Après séchage pendant 30 mn à la température ambiante, les boites sont mises à l'étuve pendant 24h à 30°C. Les cultures sont ensuite recouvertes de 8ml de gélose molle



(semi solide), qui a étéensemencée avec 500 µl d'une culture pathogène de 24h et 10mg /ml de pepsine. Parallèlement des cultures témoins sont réalisées dont la gélose semi solide ne contenant pas d'enzyme. Les boites de pétrie sont incubées pendant 24h à 30°C.

#### IV. Nature de l'effet inhibiteur

L'effet inhibiteur de la bactérie lactique peut être bactéricide ou bactériostatique pour connaître la nature de cet effet. Deux procédés sont impliqués :

##### IV.1. Premier procédé

Un morceau de gélose est pris dans la zone d'inhibition (zone transparente) puis mit dans un tube de bouillon nutritif. Puis incubé à 37°C pendant 24h.

##### IV.2. Second procédé

Un fragment de gélose pris dans la zone d'inhibition est étalé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile à la surface d'une boîte de pétri préalablement coulée avec de la gélose nutritive. Puis les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.

#### V. Durée de vie d'une bactérie nuisible en interaction avec une bactérie pathogène

##### V.1. Préparation du lait écrémé

120g de poudre du lait écrémé est rajouté dans un litre d'eau distillé stérile, le mélange est chauffe puis laissé à ébullition pendant 15mn ensuite il est réparti dans deux flacons de 200ml chacun. Les deux flacons sont autoclavés pendant 20mn à 120°C.

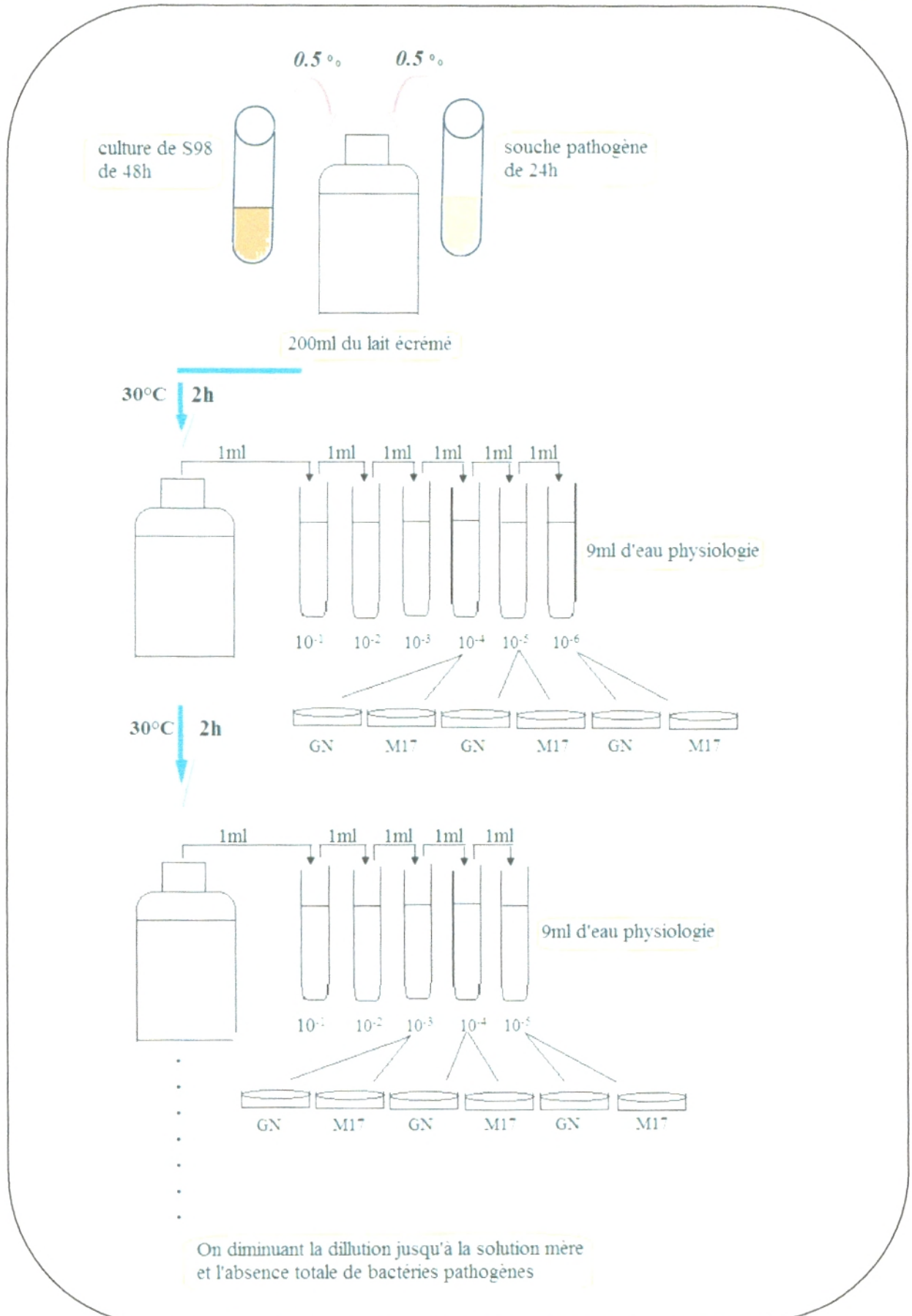
##### V.2. Ensemencement des souches

Après revivification de la souche lactique sur M17 liquide et la souche pathogène sur bouillon nutritif, 1ml de S98 et 1ml d'une bactérie nuisible sontensemencés. Dans un flacon on ajoute *Listeria*, dans l'autre *Enterococcus*  $\chi$

Après deux heures d'incubation des dilutions jusqu'à  $10^{-6}$  sont réalisées puisensemencées en profondeur pour les 3 dernières dilutions  $10^{-6}$  ·  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  en utilisant la gélose M17 pour la souche lactique et la gélose nutritive pour la souche pathogène. De nouveau les flacons sont incubés pendant 2h pour refaire les dilutions et l'ensemencement. La

manipulation est répétée toutes les deux heures en diminuant la dilution jusqu'à la solution mère.

L'incubation est prolongée jusqu'à obtention de l'absence totale de micro-organismes pathogènes (Figure 11).



**Figure 11:** Durée de vie d'une souche pathogène avec S98 ensemencées en interaction dans le lait écrémé



*Partie 3 :*  
*Résultats et Interprétation*

### I. Détection de l'effet antagonisme par la bactérie lactique

La méthode de la couche mince a donné des résultats inapparents.

Les résultats suivants sont ceux de la méthode de Fleming et al., (1985). Ils reposent sur la mesure du diamètre des zones d'inhibitions observées autour des cultures ensemencées par touche (Figure : 12).

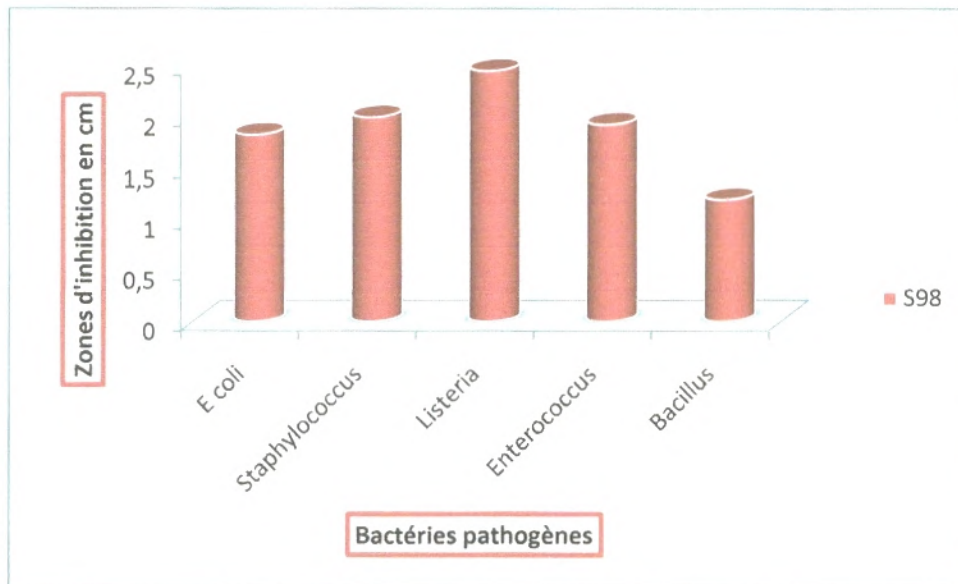


Figure 12: Zones d'inhibitions formées par l'effet antagonisme de S98

*diapète.*

La souche lactique S98 a une activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes qui se traduit par la formation des zones d'inhibitions de diamètre différent d'une espèce à l'autre. L'effet antagoniste est beaucoup plus significatif pour *Listeria* puisque la zone claire atteint 2.46 cm de diamètre.

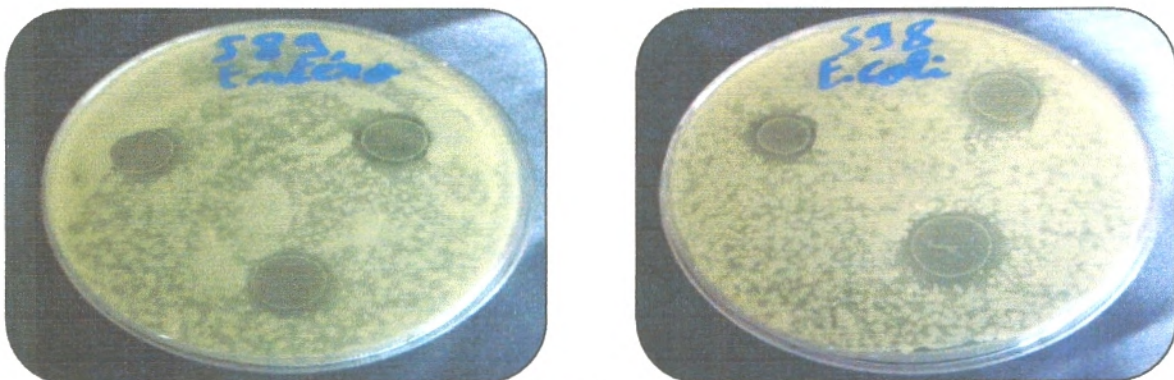


Figure 13: Zones d'inhibitions formées par l'effet antagonisme de S98

## II. Recherche des agents inhibiteurs

### II.1. Facteur acide

Pour savoir si la bactérie S98 produit des acides, le surnageant est neutralisé. La lecture des résultats consiste à comparer les inhibitions en milieu neutralisé et non neutralisé (Figure : 14).

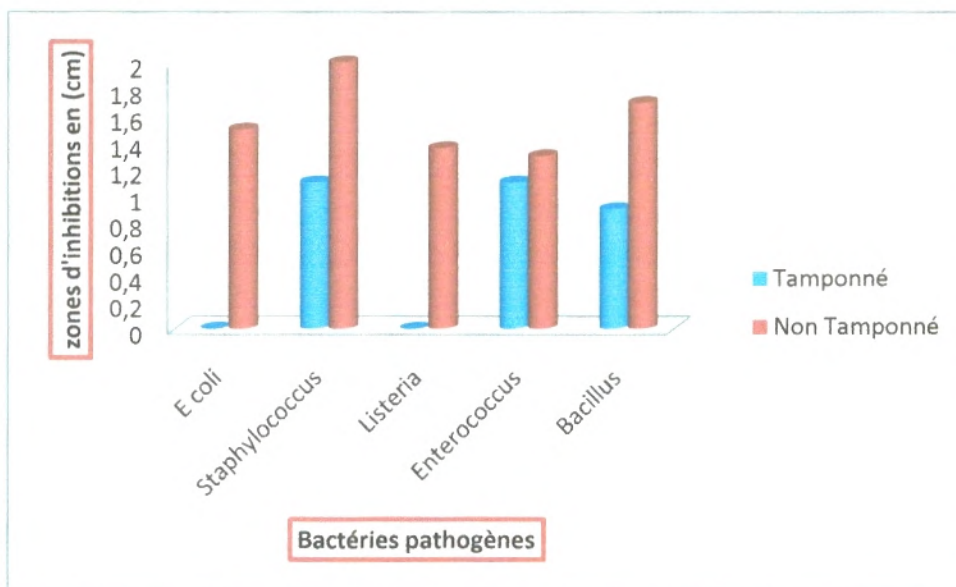


Figure 14: Zones d'inhibitions formées par S98 en milieu neutralisé et non neutralisé

*E. coli* et *Listeria* sont inhibés après production d'acide puisque toutes les zones d'inhibitions ont totalement disparues dans un milieu tamponné ce qui prouve que la souche lactique S98 produit de l'acide.

Alors qu'en présence de *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Enterococcus* les zones d'éclaircissements ont diminué légèrement d'où l'existence d'autres facteurs inhibiteurs autre que la production d'acide.

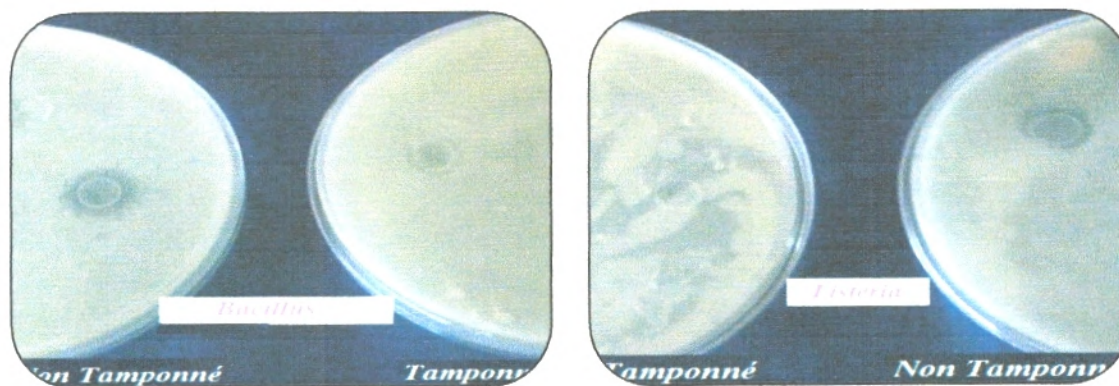


Figure 15: Zones d'inhibitions formées par S98 en milieu Tamponné et non Tamponné

## II.2. Facteur bactériocine

Pour savoir si la bactérie S98 produit des bactériocines, une enzyme de nature protéolytique est testée: **la pepsine**.

La lecture des résultats consiste à comparer les inhibitions en présence et en absence de la pepsine (Figure 16).

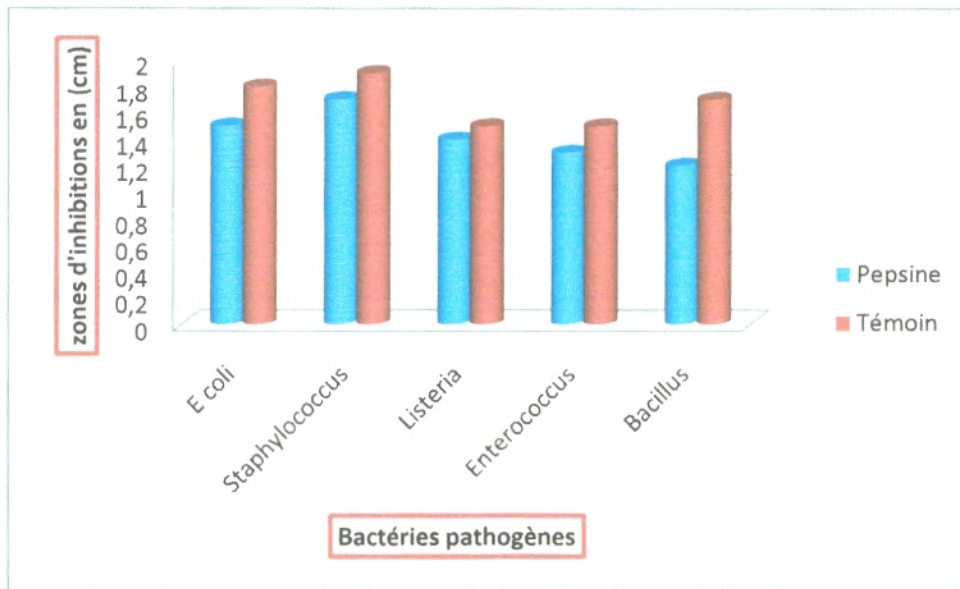


Figure 16: Zones d’inhibitions formées par S98 en présence et en absence de pepsine

Toutes les zones d’éclaircissements ont diminué légèrement dans le milieu contenant l’enzyme, ce qui prouve que la souche S98 produit une bactériocine et qui agit sur toute les bactéries nuisible.

Cette bactériocine est de nature glycoprotéique ou lipoprotéique puisque les zones ont diminué seulement. D’autres facteurs inhibiteurs peuvent exister, probablement le diacétyle.

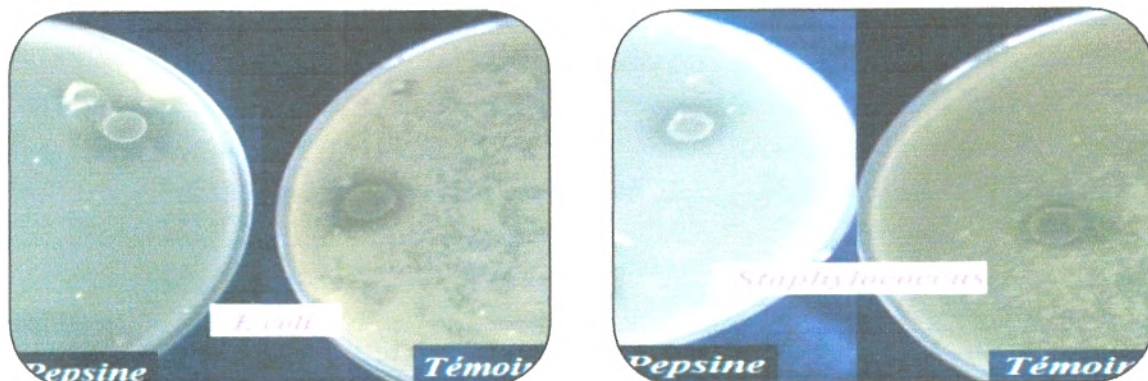


Figure 17 : Zones d’inhibitions formées par S98 en présence et en absence de pepsine

### III. Nature de l'effet inhibiteur

Les résultats montrent l'apparition de trouble dans le bouillon nutritif et des colonies à la surface de la gélose nutritive donc l'effet est bactériostatique vis-à-vis des bactéries pathogènes (Figure 18).

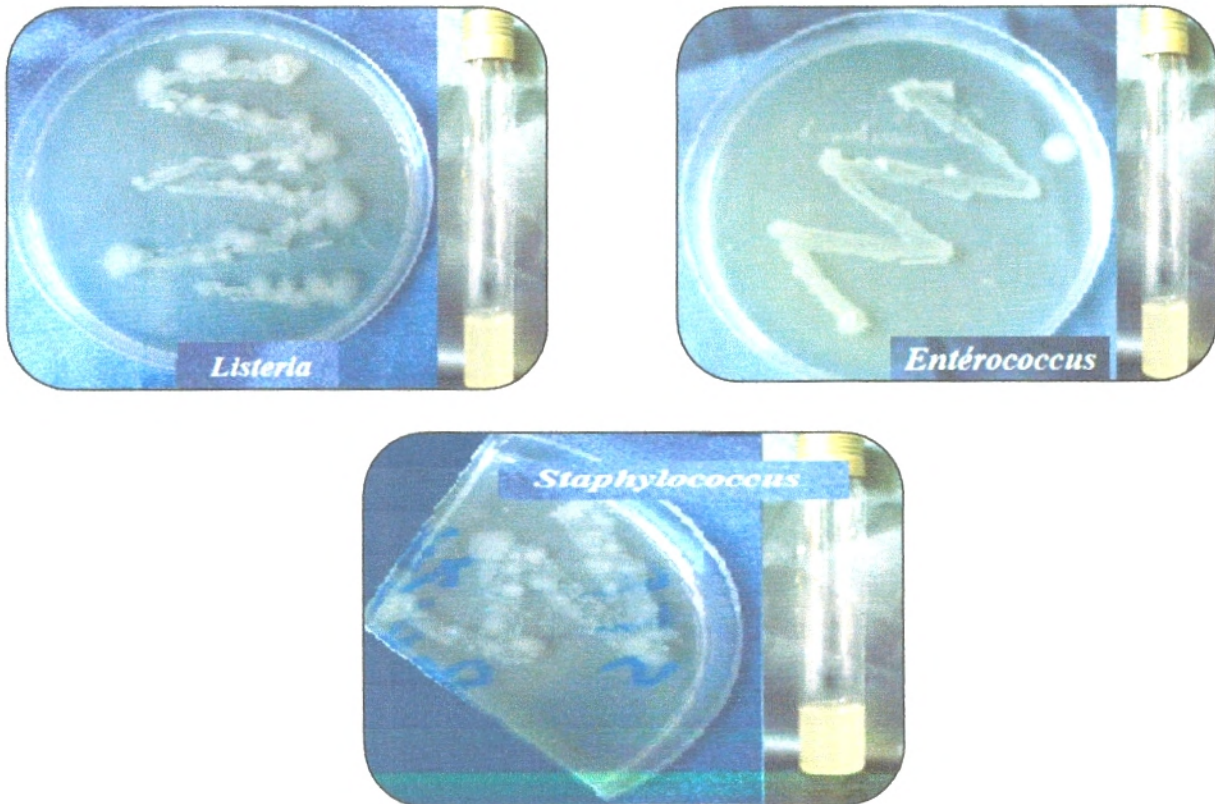
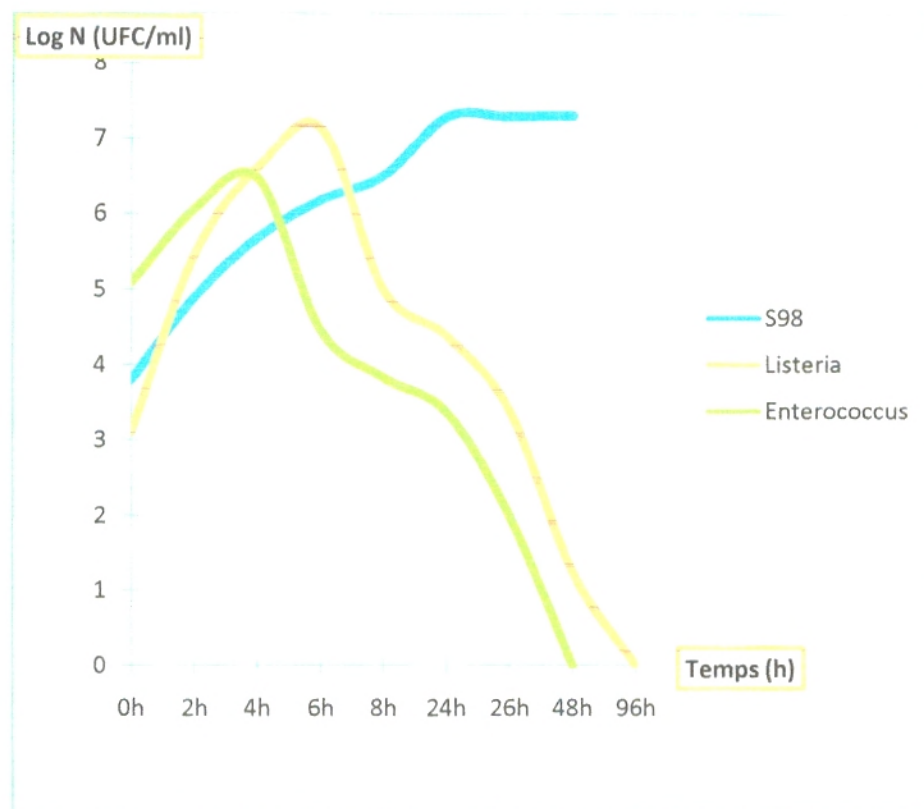


Figure 18 : Effet bactériostatique de la souche S98



#### IV. Durée de vie d'une bactérie lactique en interaction avec une bactérie pathogène

La lecture des résultats consiste à compter le nombre des colonies qui apparaissent toute les deux heures jusqu'à l'absence totale.



**Figure 19:** Croissance de la souche S98ensemencée en interaction avec *Listeria* et *Enterococcus* dans le lait écrémé

Les bactéries pathogènes en interaction avec la bactérie lactique se développent pendant les premières heures parce qu'elles trouvent le lait un milieu favorable pour leur développement. Puis il ya une décroissance à partir de 4h pour *Enterococcus* et à partir de 6h pour *Listeria* jusqu'à l'arrêt totale du développement à 48 pour *Listeria* et à 96h pour *Enterococcus* ;

Alors que la souche lactique croit progressivement au début et après 24h elle devient stationnaire.



***Partie 4 :***  
***Discussions***

L'homme utilise depuis longtemps, consciemment ou non, les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains microorganismes grâce à la synthèse de molécules [Jasniewski., 2008]. Ils fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bioconservation des denrées alimentaires [Garmen, M et al., 2000], leur pouvoir antagoniste résulte aussi de la production des bactériocine limitant la croissance de certains germes pathogènes [Tabak, S., 2007].

Une série d'expériences sur l'étude des interactions entre la souche lactiques S98 appartenant à la sous espèce de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* et cinq bactéries pathogènes et d'altérations (*E coli*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Enterococcus*) a été étudié est permis de savoir que :

La souche S98 exerce un effet antagoniste sur cinq bactéries pathogènes testées (Figure 14).

De nombreux travaux montre l'effet inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes comme : *E coli* et *Bacillus cereus*. Parmi ces travaux ceux de **Herreros et al., (2005)** ; **Kostzynska et al., (2006)** ; **Levroy et al., (2006)**.

L'apparition des zones d'inhibitions au cours des interactions entre la souche S98 et les bactéries pathogènes nous a conduit à rechercher si les facteurs acides ou bactériocines existe ou non. En effet en utilisant la méthode de Fleming et al ., (1985) les résultats montrent que la souche S98 produit des acides organiques (pH 4.8) (Figure 12). Effectivement le genre *Lactococcus* est utilisé toujours dans la fabrication des fromages. L'acide produit inhibe totalement *E coli* et *Listeria* on peut dire que les deux bactéries sont très sensibles à l'acide. Selon **Corlett et al., (1980)**, la majorité des espèces bactériennes pathogènes ne peuvent pas se développer à pH inférieur à 4. D'après **Bourgeois et al., (1996)**, *Listeria* se développent à pH neutre. Alors qu'en présence de *Bacillus*, *Enterococcus* et *Staphylococcus*, les zones d'inhibitions diminuent dans le milieu tamponné pH 6.7. La non disparation des zones explique la présence d'autres agents inhibiteurs qui peuvent être des bactériocines ou autre (Figure 14).

La recherche des bactériocines par la méthode de Fleming et al., (1985) consiste à utiliser une enzyme protéolytique car selon **Aymerich et al., (2000)** les bactériocines sont inactivées par les protéases. Les résultats obtenus montrent que la souche S98 produit une bactériocine

qui inhibe toutes les bactéries pathogènes. **Bouras et al., (2000)** ; **Achemchem et al., (2004)** ont montré aussi que la bactériocine produite par *Lactococcus* est sensible à la pepsine.

L'action de l'enzyme protéolytique n'élimine pas mais diminue légèrement l'inhibition ce qui montre que l'agent inhibiteur contient seulement un composé mineur de caractère protéolytique. Selon **Jimenez-Diaz et al., (1993)**, la bactériocine peut prendre la forme d'un complexe hétérogène incluant des groupements lipidiques (lipoprotéique) ou saccharidiques (glycoprotéique). En effet la bactériocine qui produit S98 sont de nature glycoprotéique ou lipoprotéique puis qu'il y a diminution et non disparition des zones dans le milieu avec enzyme par rapport au milieu sans enzyme (Figure 16). D'autres facteurs inhibiteurs peuvent exister comme le diacétyl puisque la souche S98 est un biovar diacetylactis.

D'après **Dacosta., (2000)** les bactéries lactiques ont un effet antagoniste bactéricide ou bactériostatique. Selon les travaux de **Wessels et al., (1996)** ; **Brillet et al., (2004)** les bactériocines produites par *Lactococcus sp*, *Lactobacillus sp* et *Carnobacterium sp* ont une action bactériostatique sur une large gamme des bactéries pathogènes.

La souche S98 a présenté un effet bactériostatique vis-à-vis des bactéries pathogènes (Figure 18).

L'inhibition des bactéries pathogènes par la bactérie lactique varie selon les facteurs antagonistes produits par ces dernières et le degré de sensibilité des bactéries pathogènes.

L'étude de la durée de vie de deux bactéries pathogènes : *Listeria* et *Enterococcus* en interaction dans le lait écrémé avec la souche S98 montre après une croissance de 4h ou 6h dans le lait qu'elles trouvent favorable à leur développement que *Listeria* est inhibée totalement à 48h et *Enterococcus* après 96h d'incubation suite à la production d'acide de bactériocine et autres facteurs inhibiteurs (Figure 19).

L'étude de l'activité antimicrobienne de la bactérie S98 appartenant au genre *Lactococcus* et à l'espèce *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* à l'égard des bactéries pathogènes *E coli*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Enterococcus* montre que : La souche S98 a un effet antagoniste. En effet la méthode de Fleming et al., (1985) utilisée a révélé la production d'acide et des bactériocines de nature glycoprotéiques ou lipoprotéiques ainsi que d'autre agents inhibiteurs comme le diacétyle. Tous ces facteurs ont un effet bactériostatique sur les bactéries pathogènes.

La durée de vie d'une bactérie pathogène en antagonisme avec *Lactococcus lactis* a montré que la souche S98 inhibe *Listeria* après 48h et *Enterococcus* après 96h.

Nos résultats laissent entrevoir différents perspectives notamment :

- L'extraction, la purification et l'identification les bactériocines détectées ;
- La confirmation de la production du diacétyle.

[manua\\_lab2\\_sedimentturbidity.html&prev=search%3Fq%3DE.coli%2Bin%2Bthe%2Bnormal%2Bfecal%2Bflora%2Bof%2Banimals%26hl%3Dfr%26lr%3D](#)

- **Kasper, M. L., A. F. Reeson, S. J. B. Cooper, K. D. Perry, and A. D. Austin ., 2004.** Assessment of prey overlap between a native (*Polistes humilis*) and an introduced (*Vespula germanica*) social wasp using morphology and phylogenetic analyses of 16S rDNA. *Mol. Ecol.* 13:2037-2048.
- **Klaenhammer. T.R ., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- **Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, et G. Reuter ., 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*
- **Klipper, W.T. Phillips, B. Goins, B.G. Cook, C. Martin, L. Lemen, P.A. Jerabek, S. Khalvati, P.T. Fox, R.O. Cliff, V. Kwasiborski, A.S. Rudolph ., 1984.** Chapter 12 - Tissue Oxygen Delivery and Tissue Distribution of Liposome Encapsulated Hemoglobin *Blood Substitutes, Present and Future Perspectives, 1998, Pages 147-160.*
- **Kong, Y. –C ., S. –C. Fung, and D. M. K. Lam ., 1980.** The postnatal development of glycinergic neurons in rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 193 : 1127-1135.
- **Kostzynska M et Bachand , A ., 2006.** Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products : a review. *Can.j.microbial.* 52, 1017-1026.
- **Kozak W ., 1978.** Lactostrepci,s acid bacteriocins produced by lactis Streptococci. *J. Dairy* : 45-247-257.
- **Lefrançois P ., 2006.** Probiotiques- Société canadienne de recherche sur les PSN.
- **Leveau J-Y et Bouix M ., 1993.** Microbiologie industrielles. Les microorganismes d'inéret industriel. Tec et Doc, Ed Lavoisier. Paris-France.
- **Levesque E ., 2007.** Les probiotiques. Source :Longévie. Documantation d'Internet : [www.imaage-paris.com/actu/article](http://www.imaage-paris.com/actu/article).
- **Levroy F ., Verluyten J et De Vuyst ., 2006.** Functional meat startercultures for improved sausage fermentation. *Ont. J. Food microbial.* 106,270.
- **Liu, M., and Yang, Y., 2003.** Extensinal collapse of the Tibetan Plateau: Results from three-dimensional finite element modeling: *J. Geophys. Res.*, v. 108, p. doi:10.1029/2002JB002248.
- **Lonvaud-Funel A , Joyeux A et Dessens C ., 1988.** Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Sci. Food. Agric.* 44: 183-191
- **McKay L.L et Baldwin K.A ., 1990.** Applocations for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol, Rev.* 87 :3-14.

**Tableau :** dénombrement de la souche S98 dans le lait écrémé

D	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
T						
2h				33	03	12
4h			IND	152	192	
6h		IND	112	84		
8h	IND	125	55			
24h	35	17				
26h	33					

D : Dilutions

T : Temps

## Annexes 2 :

### Les milieux de culture destinés dans notre étude :

#### La gélose M17

Tryptone	2.50g
Peptone pepsique de viande	2.50g
Peptone papainique de soja	5.00g
Extrait autolytique de levure	2.50g
Extrait de viande	5.00g
Lactose	5.00g
Glycérophosphate de sodium	19.00g
Sulfate de magnésium	0.25g
Acide ascorbique	0.50g
Agar bactériologique	15.00g
Eau distillé	1000ml
pH	7.2 ± 0.1

Autoclavage à 121°C pendant 15 min

#### Bouillon nutritif

Peptone	15g
Extrait de levure	3g
D(+) Glucose	1g
NaCl	6g
Eau distillé	1000ml
pH	7.2 ± 0.1

Autoclavage à 121°C pendant 15 min

#### Gélose nutritive

Peptone	15g
Extrait de levure	3g
D(+) Glucose	1g
NaCl	6g
Agar	23g
Eau distillé	1000ml
pH	7.3 ± 0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15 min



**Bouillon M17**

Tryptone	2,50 g
Peptone pepsique de viande	2,50 g
Peptone papaïnique de soja	5,00 g
Extrait autolytique de levure	2,50 g
Extrait de viande	5,00 g
Lactose	5,00 g
Glycérophosphate de sodium	19,00 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Eau distillé	1000ml
pH	7,1 ± 0,2

Autoclavage à 121°C pendant 15 min

**Gélose nutritive semi solide**

Bouillon nutritif	14g
Gélose nutritive	20g
Eau distillé	1000ml
pH	7.3 ± 0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15 min

