



Master : Biotechnologie Microbienne

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Isolement et identification des
microorganismes à effet anti-*Listeria* à
partir de fromage affiné**

Présenté par : HAMMI Ikram

Stage effectué à : Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des
Aliments à l'ESTF

Encadré par :

- EST- Fès : BELKHOU Rajae

Soutenu le : 26/06/2012

Jury :

- Pr. BELKHOU Rajae
- Pr. ANANOU Samir
- Pr. FIKRI BEN BRAHIM Kawtar
- Pr. BEKHTI Khadija
- Pr. ALAMI Abdelhakim

Année universitaire : 2011-2012



RÉSUMÉ

La contamination des aliments est un problème majeur pour le consommateur. L'exploitation des interactions microbiennes est un nouveau moyen pour lutter contre les germes indésirables. Parmi les propriétés métaboliques à intérêts technologiques : les substances antagonistes de germes indésirables ou pathogènes (spécifiquement les bactériocines). Elles sont attribuées aux nombreuses bactéries, surtout les bactéries lactiques isolées des dérivés laitiers.

L'objectif de ce travail est le criblage des germes producteurs de substances anti-*Listeria* de type bactériocine à partir de la matrice fromagère (Emmental, Brie, Bleu Formital et Saint Paulin). Des méthodes biochimiques et moléculaires sont utilisées pour identifier les isolats. Quatre isolats présentant une activité anti-*Listeria* ont été identifiés, dont deux comme étant *Penicillium roqueforti* et *Staphylococcus pasteurii*. La recherche de l'antagonisme bactérien (anti-*Listeria monocytogenes*) est réalisée par différentes méthodes (double couche, diffusion par puits et par disque). Les meilleurs résultats sont obtenus par la méthode de diffusion par disque. Les différents tests utilisés pour l'identification de l'agent inhibiteur impliqué dans l'inhibition de *L. monocytogenes* suggèrent la nature protéique des substances sécrétés par les isolats Br4, E2 et E5. A l'inverse la substance inhibitrice de L'isolat B18 semble de nature non protéique. Les différentes substances inhibitrices montrent une bonne stabilité vis-à-vis du pH et de la température. Le suivi de la cinétique de croissance des souches montre que la production de la substance active se fait à la fin de la phase exponentielle de croissance.



ABSTRACT

Food contamination is a major problem for the consumer. Exploitation of microbial interactions is a new way to fight against unwanted germs. Of interest to the metabolic properties: substances as antagonists of unwanted germs or pathogens (specifically bacteriocins). They are assigned to many bacteria, especially lactic acid bacteria isolated from dairy derivatives.

The objective of this work is the screening of microorganisms producing substances like anti-*Listeria* bacteriocin from the cheese matrix (Emmental, Brie, Blue Formital and Saint Paulin). Biochemical and molecular methods are used to identify isolates. Four isolates with an anti-*Listeria* were identified, including two as *Staphylococcus* and *Penicillium pasteurii*. The search for bacterial antagonism (anti-*Listeria monocytogenes*) is performed by different methods (double-layer diffusion per well per disc). The best results are obtained by the disk diffusion method. The different tests used to identify the inhibitor involved in the inhibition of *L. monocytogenes* suggest the protein nature of the substances secreted by the isolates BR4, E2 and E5. Unlike the inhibiting substance appears to Isolate BL8 nonprotein nature. The different inhibitory substances show good stability against pH and temperature. Monitoring the growth kinetics of the strains showed that production of the active substance is at the end of the exponential growth phase.



LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNr** : Acide désoxyribonucléique ribosomique
- Afssa** : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- d NTP** : désoxynucléoside triphosphate
- DO** : Densité Optique
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétra acétique
- GRAS** : Generally recognized as safe
- IAA** : Industrie agroalimentaire
- KDa** : Kilo dalton
- MRS** : Man, Rogosa et Sharpe
- Nacl** : chlorure de sodium
- NCBI** : Centre national d'information pour la biotechnologie
- PCA** : Plate Count Agar
- PCR** : Réaction de polymérisation en chaine
- Pdt** : Pendant
- RM** : Rouge de Méthyle
- Sab**: Sabouraud
- TAE** : Solution tampon composée de tris, d'acide acétique et d'EDTA
- TSA**: Trypticase de Soja agar



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie



TSAYE : Trypticase de Soja agar avec extrait de levure

TSB: Trypticase de Soja bouillon

VP : Voges-Proskauer



LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées pour la PCR.....	14
Tableau 2 : Mélange réactionnel pour la PCR.....	14
Tableau 3: Suivi de l'activité anti-Listeria par la méthode de double couche au cours de temps.....	20
Tableau 4: Zones d'inhibition en fonction de temps d'incubation dans bouillon TSB à 30°C sous faible agitation.....	21
Tableau 5: Aspect macroscopique des quatre isolats producteurs de substance bio-active	22
Tableau 6: Etude phénotypique et biochimique des quatre isolats	25
Tableau 7: Espèces trouvées après l'analyse par le BLASTn	26
Tableau 8: Stabilité thermique de l'activité anti-Listeria.....	30
Tableau 9: Stabilité des substances antagonistes vis-à-vis de pH.....	31
Tableau 10 : Rapports frontaux des surnageants des souches étudiés.....	32
Tableau 11: Grandes transformations biochimiques au cours de l'affinage selon Bertrand (1988).	40
Tableau 12: Grandes familles de fromage avec leurs caractéristiques.....	41
Tableau 13: Utilisation, principe et lecture de milieu Hajna Kligler Roland.....	48
Tableau 14 : Utilisation, principe et lecture de milieu Clarck et Lubs.....	49
Tableau 15: Tableau obtenu après l'analyse de séquence nucléotidique de l'isolat Br4 par Blast	53
Tableau 16 : Présentation des résultats de dénombrement de la flore isolée.....	51
Tableau 17: Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrices.....	51



LISTE DES FIGURES

Figure 1. Concentration microbienne en fonction de type de fromage.....	18
Figure 2. Nombre d'isolats par type de fromage.....	19
Figure 3. Activité antimicrobienne de 10 isolats vis-à-vis de <i>L. monocytogenes</i> par la méthode de diffusion des disques, a : avant neutralisation des surnageants, b et c : après neutralisation.....	21
Figure 4. Evolution du diamètre d'inhibition des isolats en mm vis-à-vis de <i>L.monocytogenes</i> en fonction du temps d'incubation.....	22
Figure 5. Observation des cellules de <i>Penicillium</i> . a : macroscopique ; b : microscope...	23
Figure 6. Amplification des séquences de gène ARNr 16S des isolats E2, Br4 et E5...26	
Figure 7. Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrices.....	29
Figure 8. Chromatogramme obtenu après révélation à la ninhydrine. A) surnageant de la culture 2 ; B) surnageant de la culture 4 ; C) surnageant de la culture 5 ; D) surnageant de la culture 8 ; E) antibiotique vancomycine ; F et G) surnageant des témoins.....	32
Figure 9. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques des bactéries lactiques. La barre indique une divergence de 2% de la séquence (Ennahar <i>et al.</i> 2003).	50
Figure 10. Effet de variation de pH sur l'activité inhibitrice.....	53
Figure 11. Effet de traitement thermique sur l'activité inhibitrice.....	51
Figure 12. Chromatogrammes obtenu après séquençage des produits de la PCR (<i>Staphylococcus pasteurii</i>)	48
Figure 13. Alignement de séquence d'ADNr 16S obtenu après l'analyse des chromatogrammes avec la séquence de la base donnée la plus proche (A : isolat 2 ; B : isolat 4 ; C : isolat5)	54
Figure 14. Etude de l'antagonisme par la méthode de double couche.....	56
Figure 15. Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion par disque.....	56
Figure 16. Etude de l'antagonisme par la méthode des puits.....	57



LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Réactions biochimiques au cours de l'affinage.....	34
ANNEXE 2 : Grandes familles de fromage.....	35
ANNEXE 3 : Composition et préparation des milieux de cultures utilisés.....	37
ANNEXE 4 : Technique d'épuisement par stries selon la méthode de Nevot.....	40
ANNEXE 5 : Méthodologie de la coloration de Gram.....	41
ANNEXE 6 : Tests d'identification biochimique.....	42
ANNEXE 7 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques.....	44
ANNEXE 8 : Stabilité de l'activité antimicrobienne des isolats.....	45
ANNEXE 9 : Identification moléculaire des isolats étudiés	46
ANNEXE 10 : Chromatographie sur couche mince.....	49
ANNEXE 11 : Etude de l'anagonisme microbienne.....	50



SOMMAIRE

Dédicace	i
Remerciement	ii
Résumé	iv
Abstract.....	v
Liste des abréviations	vi
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des annexes	ix
Introduction générale	1

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Fromage	2
1. Définition	2
2. Procédé de fabrication des fromages	2
3. Types de fromages	3
4. Ecosystème microbien d'affinage et son intérêt	3
4.1. Bactéries lactiques	3
4.2. Flore secondaire	4
II. Substances antimicrobiennes	4
1. Définition	5
2. Mode d'action	5
3. Classification	6
4. Statut réglementaire	7
III. <i>Listeria monocytogenes</i>	7
1. Bactériologie	7
2. Ecologie	8
3. Maladie humaine	8
4. Mode de transmission	8

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Isolement, purification et conservation des micro-organismes de différents fromages	9
--------------------------------------------------------------------------------------------------------	---



II. Screening des isolats producteurs de substances anti-<i>Listeria monocytogenes</i>	9
1. Méthode de double couche	10
2. Technique de diffusion par disque	10
3. Technique des puits	10
III. Identification des isolats producteurs des substances anti-<i>Listeria</i>	11
1. Identification phénotypique	11
2. Identification biochimique	11
3. Identification moléculaire	13
IV. Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrice	15
V. Caractéristiques physico-chimiques des substances inhibitrices	16
1. Caractéristiques physico-chimiques des substances anti- <i>Listeria</i>	16
1.1. Effet des enzymes protéolytiques	16
1.2. Stabilité au traitement thermique	16
2. Stabilité au pH	16
VI. Séparation et caractérisation préliminaire des substances antagonistes par chromatographie sur couche mince	16

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Evaluation de la microflore des fromages affinés	18
II. Mise en évidence des inhibitions vis-à-vis de <i>Listeria monocytogenes</i>	19
1. Technique de double couche	19
2. Technique des disques	20
3. Technique des puits	22
III. Identification des isolats producteurs des substances anti-<i>Listeria</i>	22
1. Identification phénotypique	22
2. Identification biochimique	23
3. Identification moléculaire	26
IV. Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrice	27
V. Caractéristiques physico-chimiques des substances antagonistes	30
1. Effet des enzymes protéolytiques	30
2. Stabilité au traitement thermique	30
3. Stabilité pendant la conservation	31



4. Stabilité au pH.....	31
VI. Séparation et caractérisation préliminaire des substances antagonistes par chromatographie sur couche mince	31
Conclusion	33
Perspectives	34
Références bibliographiques	35



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les méthodes de conservation des denrées alimentaires ne cessent d'évoluer. Beaucoup d'efforts sont déployés pour améliorer celles qui existent et en développer de nouvelles notamment par l'utilisation des substances naturelles. Ainsi, l'exploitation des interactions microbiennes pour assurer la salubrité des aliments et lutter contre les microorganismes indésirables fait partie des différentes voies de recherches.

Les techniques classiques de conservation telle que la pasteurisation, la fermentation ou la réfrigération ne constituent pas une garantie suffisante pour lutter contre la contamination microbienne. Par ailleurs, l'emploi excessif et non contrôlé d'additifs chimiques peut engendrer des risques sanitaires pour le consommateur.

Les travaux scientifiques de Desmazeud et Cogan (1996), Wilson *et al.*, (2005), Cocolin *et al.* (2007) et Ananou *et al.* (2010) ont été consacrés à l'exploitation des métabolites antimicrobiens, comme les bactériocines, pour améliorer la qualité microbiologique des aliments.

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes*. L'application des bactériocines ou des souches bactériocinogènes dans les aliments pour y éviter le développement de bactéries pathogènes ou altérantes a donc été envisagé dans plusieurs pays.

Au Maroc, peu d'auteurs ont cherché à caractériser la flore microbienne soit du lait soit de ses dérivés et à identifier les substances produites à effet antimicrobien.

Les principaux objectifs de ce travail sont :

- Isolement, purification et identification biochimique et moléculaire des microorganismes isolés à partir de quatre fromages affinés (Brie, Bleu Formital, Emmental et Saint Paulin) ;
- Mise en évidence de substances inhibitrices anti-*Listeria* ;
- Caractérisation préliminaire de la substance inhibitrice produite par les isolats par traitement enzymatique et par chromatographie sur couche mince ;
- Étude de la stabilité des substances inhibitrices à différents pH et différentes températures.



Annexes

Annexe 1.....	40
Annexe 2.....	41
Annexe 3.....	43
Annexe 4.....	46
Annexe 5.....	47
Annexe 6.....	48
Annexe 7.....	50
Annexe 8.....	51
Annexe 9.....	52
Annexe 10.....	55
Annexe 11.....	56

II. Fromage



Le fromage est un [aliment](#) ancien dont les origines avoisinent la [préhistoire](#). Les plus anciennes traces [archéologiques](#) de fabrication du fromage retrouvées datent de l'époque de l'[Égypte ancienne](#), trouvées sur des murales dans des tombes et datant de 2000 avant JC (Vicki Reich, 2002). À l'origine, l'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait. Aujourd'hui, il s'agit plutôt d'un aliment, possédant des qualités nutritionnelles et gustatives indéniables.

1. Définition

Selon la norme FAO/OMS n° A-6 (1978, modifiée en 1990), le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait. Il est obtenu soit : a) par coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème de lactosérum ou babeurre, seul ou en combinaisons, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés. b) par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des matières obtenues à partir de lait.

2. Procédé de fabrication des fromages

Le lait de vache est utilisé pour la plupart des fromages produits. Cependant, le lait de chèvre et de brebis peut être utilisé. Les étapes principales de fabrication du fromage (coagulation, égouttage et affinage) sont généralement précédées d'une phase préalable de préparation du lait (filtration, standardisation, pasteurisation et maturation) afin d'obtenir des fromages de composition régulière et de qualité hygiénique et organoleptique bonne et constante.

- La coagulation est le passage du lait de l'état liquide à l'état solide. C'est la phase de formation du caillé. Elle est réalisée soit par acidification (voie lactique) ou bien par emprésurage (addition de la présure).
- L'égouttage consiste à retirer le petit-lait ou lactosérum du caillé et à le rendre plus ferme. À ce stade, tous les fromages sont des pâtes fraîches et non affinées.
- Le salage ou bien l'incorporation d'une quantité déterminée de NaCl pour compléter l'égouttage, contribue à la formation de la croûte, à la régulation de l'activité de l'eau et au rehaussement de la saveur de certains fromages affinés.



- L'affinage, c'est laisser s'opérer naturellement les transformations sous la double action des enzymes et de la flore bactérienne contenue dans le fromage. Il s'effectue à une température et à une humidité qui varient selon le type de fromage. Au cours de cette étape plusieurs variations microbiologiques et biochimiques constituent un cycle qui affecte le lactose, les protéines et les acides gras (tableau 11, annexe 1).

3. Types de fromages

Selon le type de caillage, égouttage, salage et affinage, on obtient différents types de fromages frais et affinés (annexe 2). Selon le type de pâte, on peut classer le fromage affiné en :

- Pâtes pressées (Tomme de Savoie, St-Paulin, Reblochon),
- Pâtes fermes non cuites (Cantal),
- Pâtes fermes cuites (Comté, Emmental),
- Pâtes molles qui sont divisées en deux sous-familles (les pâtes molles à croûte fleurie telles que Brie, Camembert et Coulommiers ; et les pâtes molles à croûte lavée comme l'Epoisse, le Livarot et le Munster).

4. Ecosystème microbien d'affinage et son intérêt

La microflore du fromage peut être divisée en 2 groupes : les bactéries lactiques qui composent le ferment ou qui sont initialement présentes dans le lait; et les microorganismes qui forment la flore secondaire (Beresford *et al*, 2001).

4.1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques forment un groupe bactérien phylogénétiquement très hétérogène (Fig.9, annexe 7) et bénéficient du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer *et al.*, 2005). Elles peuvent être homofermentaires ou hétérofermentaires (De Roissart, 1986 ; Stiles et Holzapfel, 1997).

Les bactéries lactiques regroupent 18 genres (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Axelsson, 1998 ; Klaenhammer *et al.*, 2005; Pfeiler et Klaenhammer, 2007). Néanmoins, ce sont surtout les genres *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* qui font objet d'applications en



industries agroalimentaires pour le développement d'aliments fonctionnalisés (Vandamme *et al.*, 1996). L'appellation bactérie lactique est aussi souvent étendue aux genres *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* qui leur sont apparentés et qui sont également utilisés pour la fabrication de produits fermentés et fromages divers (Klaenhammer *et al.*, 2005 ; Pfeiler et Klaenhammer, 2007).

4.2. Flore secondaire

Ce deuxième groupe comprend la flore résistante à la pasteurisation et les microorganismes (bactéries, levures et moisissures) spécifiquement sélectionnés qui contribuent à la saveur typique des fromages.

Les levures se multiplient en abondance à la surface du fromage dès le début de la période d'affinage. Leur principal effet correspond à la métabolisation de l'acide lactique ce qui entraîne une remontée du pH, laquelle favorise le développement de bactéries en surface (Guerzoni *et al.*, 2001). Elles participent également, grâce à leurs enzymes, à la dégradation des lipides (Guerzoni *et al.*, 2001 ; Suzzi *et al.*, 2001) et des protéines (Suzzi *et al.*, 2001), ce qui contribue au développement des composants d'arômes.

Les bactéries propioniques, quand à elles, jouent un rôle important dans la maturation des fromages à pâte pressée cuite tels que l'Emmental. Concernant les bactéries corynéformes, elles participent au développement de la saveur de certains fromages, à la pigmentation en jaune ou en rouge et à la production des composés soufrés qui renforcent les caractères "fromager" et "affiné" d'un fromage (Ratray et Fox, 1999 ; Arfi *et al.*, 2003).

On peut trouver aussi les bactéries à Gram-négatif: *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* et *Enterobacteriaceae*, souvent associées à un manque d'hygiène. Néanmoins, leur impact peut être positif sur la production de composés d'arôme (Dahl *et al.*, 2000 ; Deetae *et al.*, 2007 ; Deetae *et al.*, 2009), des esters, des aldéhydes et des alcools, et en raison de leur propriétés protéolytiques (Morales *et al.*, 2003) et lipolytiques (Chaves-López *et al.*, 2006 ; Sable *et al.*, 1997) impliquées dans le processus d'affinage de fromage.

III. Substances antimicrobiennes

Les additifs chimiques utilisés dans l'industrie agro-alimentaire sont connus pour leurs effets secondaires indésirables et qui dans certains cas peuvent être dangereux pour le



consommateur. Mais, il n'existe pas actuellement d'alternative permettant une bonne maîtrise de la sécurité alimentaire.

Une méthode naturelle de conservation à vu le jour, c'est la bio-conservation. Elle est basée sur l'utilisation de microflore (naturelle et/ou contrôlée) et/ou de substances antimicrobiennes produites par cette dernière (Stiles, 1996).

Il existe différentes familles de substances antimicrobiennes (De Vuyst et Vandamme, 1994): les killers, toxines produites par des levures ; les thionines, d'origine végétale ; les défensines, d'origine animale et ; les bactériocines, produites par des bactéries.

1 .Définition

Les substances antimicrobiennes sont des substances qui tuent (activité bactéricide), ou ralentissent la croissance (activité bactériostatique) des microbes tels que les bactéries, les mycètes ou les virus (activités antibactérienne, antimycosique ou antivirale).

En sécurité alimentaire, les bactéries lactiques (ou leur bactériocines) sont très prometteuses en association (Hurdle Technology) avec d'autres techniques de préservation des aliments (Ananou *et al.*, 2010 ; Ammor *et al.*, 2006; Budde *et al.*, 2003 ; Lücke *et al.*, 2000). Les bactériocines se définissent comme des molécules de nature protéique, synthétisées par voie ribosomique, secrétées dans le milieu extracellulaire et douées d'une activité bactéricide dirigée essentiellement contre des espèces taxonomiquement proches de la souche productrice (Diep et Nes, 2002).

2. Mode d'action

Les bactériocines ont un mode d'action lié à la [membrane](#) des bactéries. Elles se fixent à certains récepteurs membranaires et y provoquent la formation de pores (Ennahar *et al.*, 2003). La membrane est ainsi rendue perméable à certains composés tels les ions, les molécules d'[adénosine-tri-phosphate](#) ce qui est généralement létal pour la bactérie-cible.



3. Classification

Selon leurs caractéristiques structurales et leurs activités biologiques, les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes (Franz *et al.*, 2007; Ness *et al.*, 2007; Willey van der Donk, 2007; Biernbaum Sahl, 2009) :

- **Classe I** : Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés soufrés formés, post-traductionnellement. La **classe Ia** comprend des peptides cationiques hydrophobes contenant jusqu'à 34 acides aminés et la **classe Ib** comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe *et al.*, 2001). Ils comprennent la nisine, découverte en 1928 (Rogers *et al.*, 1928).
- **Classe II** : Peptides de taille inférieure à 10 kDa, thermostables non lantibiotiques. Cette classe est divisée en trois sous-classes. La **sous-classe IIa** : les peptides contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée (Fimland *et al.*, 2000). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Exemple : Sakacine P, Curvacine A, Entéroicine A. La **sous-classe IIb** comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. La **sous-classe IIc** contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes. Exemple : Plantaricine 4.
- **Classe III** : Comprend les grandes protéines (supérieure à 30 kDa) thermolabiles. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A (Joerger *et al.*, 1986), l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium* (López-Lara *et al.*, 1991), la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2007).
- **Classe IV** : C'est une nouvelle classe créée pour inclure le peptide antibactérien circulaire et les bactériocines présentant des portions non protéiques (lipidiques et/ou saccharidiques). La première protéine circulaire décrite est l'entéroicine AS-48 (Maqueda *et al.*, 2004).



4. Statut réglementaire

En général, les caractéristiques suivantes doivent être prises en compte lors de la sélection des souches productrices de bactériocines pour les applications en industrie alimentaire (Ananou *et al.*, 2007).

- La souche productrice devrait de préférence avoir le statut GRAS,
- Selon l'application, la bactériocine devrait avoir un large spectre d'inhibition comprenant des agents pathogènes,
- Thermo-stabilité,

La présence des souches productrices ne devrait pas influencer la qualité nutritionnelle et la saveur de l'aliment, mais peut éventuellement l'améliorer. Il est essentiel, dans certains pays de faire la distinction entre les bactériocines et les antibiotiques, car le règlement interdit souvent l'utilisation des antibiotiques dans les aliments (Wessels *et al.*, 1998).

IV. Listeria monocytogenes

C'est la seule espèce du genre *Listeria* pathogène pour l'homme. Décrite pour la première fois en 1926, et jusqu'aux années 50, elle a été considérée comme une curiosité bactériologique (Afssa, 2000). Dans les années 1979/1980, *Listeria monocytogenes* a été identifiée comme une des bactéries responsables d'infections d'origine alimentaire et, depuis cette époque, les *Listeria* ont suscité de nombreuses inquiétudes chez les consommateurs.

1. Bactériologie

Il s'agit d'un bacille de petite taille, Gram positif, asporulé et cultivé en absence ou en présence d'oxygène. Sa température optimale de croissance est de 30 à 37°C. *L.monocytogenes* réagit positivement au test de la catalase et est oxydase négative. Elle a la capacité de se multiplier à de basses températures (jusqu'à 2°C) et peut survivre à une activité de l'eau de 0,83. Elle fermente le glucose sans dégager de gaz, produit de l'acétyl-méthyl-carbinol (réaction de Voges-Proskauer positif). Elle ne possède pas d'uréase, ne produit ni indole ni H₂S mais hydrolyse rapidement l'esculine.



2. Ecologie

Listeria est une bactérie ubiquiste, tellurique, très largement répandue dans l'environnement, et qui possède de grandes capacités de résistance dans le milieu extérieur. Dix à trente pour cent des bovins, ovins, porcins et poulets hébergent naturellement cette bactérie dans leur tube digestif. Dans la plupart des cas, les contaminations résultent de l'ingestion d'aliments fortement contaminés

3. Maladie humaine

Les infections à *L.monocytogenes* sont sérieuses. La durée d'incubation est comprise entre 48 heures et 3 mois (moyenne 1 mois). Le portage asymptomatique au sein de la population générale est estimé à 1 à 20 %. Les infections se manifestent par des atteintes du système nerveux central (méningites, méningo-encéphalites, plus rarement encéphalites, abcès du cerveau), septicémie. Chez la femme enceinte, la maladie se manifeste sous forme de syndrome pseudo-grippal mais peut être à l'origine d'avortement, mort *in utero*, prématurité, infection néo-natale. Chez le nouveau-né, les infections représentent 60 % des cas de listériose humaine. La létalité est importante, de 20 à 30 % selon les études. Des récurrences impliquant la même souche ont été décrites, principalement chez les sujets immunodéprimés (Manuel terrestre de l'OIE, 2005).

4. Mode de transmission

Il existe 2 modes possibles de transmission de la maladie (Afssa, 2000) :

- **Direct** : transmission par voie hématogène (listériose congénitale). Chez l'homme, la transmission de la mère au [fœtus](#) peut se faire par voie digestive ou par voie respiratoire ; transmission par contact direct est possible mais rare ; ou bien transmission par [infections nosocomiales](#).
- **Indirect** : transmission par l'intermédiaire d'un vecteur inanimé comme les produits d'origine animale (voie digestive) ; transmission par voie respiratoire des poussières est envisageable, mais elle est rare ; ou bien transmission par contamination par des tiques porteuses de *Listeria*.



I. Isolement, purification et conservation des micro-organismes de différents fromages

L'étude est réalisée sur plusieurs types de fromages affinés comme l'Emmental (pâte dure), le Saint Paulin (pâte ferme/semi-dure non cuite), le Brie (pâte molle à croûte fleurie) et le bleu formital (pâte persillée) dont la durée d'affinage et, les conditions ainsi que l'origine du lait de fabrication diffèrent (CODEX STAN 283-1978).

Ces fromages proviennent d'un supermarché, en respectant les conditions aseptiques d'échantillonnage. Ils sont conservés au laboratoire temporairement au réfrigérateur.

Pour chaque fromage, 10 g de croûte sont homogénéisés dans 100 ml d'eau péptonée stérile (EPS). À partir de ces solutions mères, des séries de dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-8} sont réalisées. Afin de dénombrer la population microbienne, 100 μ l de chaque dilution sontensemencés en surface sur différents milieux : MRS, M17, PCA et Sabouraud pour le dénombrement des bactéries lactiques, de la FMAT, des levures et des moisissures respectivement.

Après 1 à 5 jours d'incubation à 30°C, l'ensemble des colonies est repiqué plusieurs fois selon la méthode de Nevoit pour aboutir à une culture pure (voir annexe 3). Les isolats purifiés sont conservés à -20°C dans le milieu d'isolement utilisé précédemment et supplémenté de glycérol à 30 % (milieu cryogénique).

Le comptage des colonies est valable que pour les boîtes contenant de 30 à 300 colonies. Le calcul de la concentration est fait selon la relation suivante :

$$\text{UFC /ml} = \text{Nombre de colonies} \times 1 / V \times 1 / D$$

V étant le volumeensemencé et D la dilution prise en compte

II. Screening des isolats producteurs de substances anti-*Listeria monocytogenes*

Le principe de la détection de l'activité antimicrobienne est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture solides ou semi-solides pour inhiber la croissance d'un micro-organisme indicateur sensible comme *L.monocytogenes*. Plusieurs techniques sont utilisées : la méthode de double couche, la technique de diffusion par disque et la technique des puits.



Ces essais sont réalisés sur une culture pure de *L.monocytogenes* âgée de 18 h et diluée au $1/10^{\text{ème}}$ dans le milieu TSBYE contenant 0,75 % d'agar et maintenu en surfusion à 45°C. D'autres part, les cultures des isolats testés sont réalisées dans les bouillons d'isolement et incubés à 30°C pendant 1-3j Les surnageants sont obtenus par centrifugation de ces cultures à 10000 trs/min pendant 15 min.

1. Méthode de double couche

Sur des boîtes de pétri contenant de la gélose TSAYE sont coulées 10 ml de la culture gélosée en surfusion de *L.monocytogenes*. Après séchage des boîtes à 30°C pendant 2 h, 100 µl d'une culture âgée de 1 à 3 jours des isolats testés y sont étalés. La mise en culture de ces derniers a été réalisée en milieu tamponné (tampon phosphate 0,2 M, pH 7) pour exclure l'inhibition de *L.monocytogenes* sous l'effet de l'acidité. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 h. Les zones d'inhibition de la souche indicatrice autour des colonies sont examinées. En parallèle, pour éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène, un deuxième test est réalisé dans des conditions d'anaérobiose. Un volume de 100 µl des isolats testés est coulé stérilement dans une boîte de pétri. Il est ensuite recouvert par la même culture de *L.monocytogenes*. L'incubation des boîtes et leur lecture sont réalisées comme pour le premier essai ([Annexe 11](#)), ([Siswanto et al, 1996](#)).

2. Technique de diffusion par disque

La détection des substances antagonistes s'est faite par la technique de double couche. Les boîtes de gélose TSA sont recouvertes de la culture diluée de *L.monocytogenes* maintenue en surfusion. Des disques en papier Whatman n°III stériles préalablement imbibés de surnageants des isolats testés sont déposés à la surface de la gélose. L'élimination de l'effet des acides organiques sur *L.monocytogenes* est réalisée par la neutralisation des surnageants avec une solution stérile de NaOH 1N. Après séchage à température ambiante durant 30 min, les boîtes sont incubées une première fois à 4°C pendant 4 h pour assurer la diffusion des substances antagonistes puis à 30°C pendant 24 h. L'inhibition de *L.monocytogenes* s'est traduite par la formation de zones d'inhibition claires autour des disques. Leurs diamètres sont donnés en mm ([Annexe11](#)), ([Siswanto et al, 1996](#)).

3. Technique des puits

Sur le milieu gélosé TSA, 7 ml de la culture pure de *L.monocytogenes* diluée au $1/10^{\text{ème}}$ et maintenue en surfusion sont coulés en sur-couche. Des puits de 5 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'une pipette pasteur (5 puits par boîte de pétri). Ils sont ensuite remplis par



60 à 80 µl de surnageant obtenu après centrifugation d'une culture des isolats testés et neutralisé avec une solution de NaOH 1N. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 1 à 3 jours. L'inhibition de la souche indicatrice s'est traduite par la formation de zones d'inhibition claires autour des puits. Leurs diamètres sont donnés en mm ([Annexe 11](#)), ([Siswanto et al, 1996](#)).

III. Identification des isolats producteurs de substance inhibitrice

L'identification phénotypique, biochimique et moléculaire n'est établie que pour les isolats ayant révélé une activité anti *L. monocytogenes*.

1. Identification phénotypique

➤ **Examen macroscopique des colonies**

Il a consisté à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface et la couleur des colonies sur les milieux d'isolement utilisés.

➤ **Examen microscopique**

- **État frais**

On a prélevé une colonie stérilement à l'aide de l'anse dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. L'observation est réalisée au microscope optique aux grossissements X400 et X1000 en présence d'huile à immersion pour les champignons et les bactéries respectivement.

- **Coloration de Gram**

Afin de différencier entre les bactéries Gram (+) et Gram (-), une coloration de Gram est réalisée pour chaque isolat de bactéries selon le protocole décrit par Prescott et *al.*, 2003 (voir annexe 5).

2. Identification biochimique

➤ **Test de la catalase**

La capacité d'une bactérie à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est démontrée par la présence de la catalase. Une colonie, prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une anse stérile, est mise en suspension dans une goutte d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de catalase et que le test est positif (Prescott et *al.*, 2003).

➤ **Test de l'oxydase**

Ce test révèle la présence du cytochrome C oxydase. Une colonie pure prise du milieu gélosé est déposée sur du papier Whatman n°III imbibé de N-diméthyle Paraphénylène



Diamine (PDA). Le développement d'une couleur violette, due à l'oxydation du PDA par le cytochrome C oxydase, signifie que le test est positif (Kovacs et *al.*, 1995).

➤ **Test du milieu Hajna Kligler Roland**

L'utilisation de ce milieu a permis la révélation de quatre caractères chez le microorganisme étudié : l'utilisation du glucose et du lactose, la production de H₂S et la production de gaz. Le milieu gélosé est préparé en tubes inclinés. Après solidification, le milieu est ensemencé à la fois par striation de la pente où il y a une aérobiose relative et, par simple piqûre centrale du culot où règne l'anaérobiose favorisant respectivement l'oxydation du lactose et la fermentation de glucose (Annexe 6). Essai de faire un schéma du tube incliné montrant la pente et le culot formé par le milieu gélosé.

➤ **Test du milieu Clarck et Lubs**

Ce test a permis une différenciation entre la fermentation d'acides mixtes et la fermentation butane-diol par la recherche de l'acétoïne. On a ensemencé le milieu liquide par une colonie d'une culture fraîche, l'incubation est faite à 30°C pendant 1 à 3 jours. La fermentation d'acide-mixte mise en évidence par le Rouge de Méthyle (RM) et la fermentation butane-diol par la recherche de l'acétoïne selon la réaction de Voges-Proskauer (VP) (Annexe 6).

➤ **Test de milieu du citrate de Simmons**

Il a permis de mettre en évidence l'utilisation de citrate comme seule source de carbone et d'énergie. L'alcalinisation de milieu gélosé en tube incliné qu'on a ensemencé par des stries serrées, est mise en évidence par un indicateur de pH le bleu de bromothymole. La présence des colonies tout au long de la strie centrale d'ensemencement et le virage de l'indicateur coloré au bleu indique que les microorganismes sont citrate positifs.

➤ **Test de milieu mannitol mobilité**

Ce test a permis la révélation de deux caractères chez les bactéries testées : l'utilisation du mannitol et la mise en évidence de la mobilité. Une colonie bactérienne est prélevée stérilement à l'aide d'une anse de platine pour ensemencer des tubes contenant un volume de 10 ml du milieu mannitol mobilité stérile. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24h. Le virage du rouge de phénol au jaune révèle la fermentation du mannitol. La mobilité, quant à elle, est mise en évidence par la présence d'un trouble dans tout le milieu.

➤ **Effet de la température sur la croissance cellulaire**



Les souches obtenues sont incubées à différentes températures (30, 40 et 60°C) pendant 48 h après leur ensemencement dans le bouillon utilisé pour leur isolement. Chaque tube contenant 10ml de milieu stérile (M17 et MRS pour les bactéries lactiques, Sabouraud pour les moisissures et les levures, PCA pour la FMAT) est ensemencé par une colonie portée stérilement à l'aide d'une anse de platine. La croissance cellulaire est mise en évidence par la présence d'un trouble

➤ **Effet du NaCl sur la croissance cellulaire**

Différents pourcentages d'une solution pure de NaCl (2%, 4% et 6,5%) sont ajoutés aux bouillons de culture utilisés pour l'isolement. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 48 à 120 h. Une croissance dans le tube testé révèle que le test est positif.

➤ **Fermentation des sucres**

Un tube contenant 10ml d'eau peptonée stérile additionné d'un sucre comme source de carbone (mannitol, sucrose, ribose, xylose, arabinose, galactose et fructose) est ensemencé par une colonie de l'isolat à tester dans des conditions stériles. Le virage de l'indicateur de pH, rouge de phénol au jaune indique l'acidification de milieu due à la fermentation du sucre utilisé. L'utilisation des cloches de Durham indique s'il y a production ou non de gaz carbonique.

3. Identification moléculaire

L'étude génotypique est effectuée pour les isolats qui ont montrés un intérêt biotechnologique : production de substances inhibitrices. Chaque isolat est identifié au niveau de l'espèce par séquençage du gène codant pour l'ADNr 16S.

➤ **Extraction de l'ADN**

Le matériel microbiologique est récupéré à partir de cultures pures âgées de 24 h. L'ADN est extrait par choc thermique selon le protocole décrit par Boubendir *et al.* (2011) (voir annexe 9). Chaque isolat est identifié au niveau de l'espèce par séquençage du gène de l'ADNr 16S (1400 paires de bases) après son amplification par « réaction de polymérisation en chaîne » (PCR) en présence des couples d'amorces (tableau 1), Fd1/ Rs16 (pour les bactéries) et Its1/Its4 (pour les levures et moisissures) (Weisberg *et al.*, 1991 ; Boubendir *et al.*, 2011).



Tableau 1: Amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S.

Primer	Séquence
Fd 1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
Rs 16	5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'
Its 1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
Its 4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

➤ Amplification

La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur de type B960 selon le protocole suivant : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles de PCR à 94°C, 55°C et 72°C pendant 30 sec, 20 sec et 1 min 30 sec respectivement suivie par une étape d'extension finale à 72°C pendant 5 min. Le mélange réactionnel de cette amplification est présenté dans le tableau 2 (voir annexe 9).

Pour vérifier la réussite de l'amplification, on a utilisé deux témoins : un témoin négatif (T-) où l'ADN du mélange réactionnel est remplacé par 2 µl d'eau ultrapure stérile et un témoin positif (T+) contenant 2 µl de l'ADN d'une souche dont l'amplification est toujours réussie.

Tableau 2: Mélange réactionnel pour la PCR

Réactifs	volume (µl)	concentration finale
Tampon Taq (10X)	4	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	1, 2	1,5 mM
dNTPs (1 mM)	4	0,2 mM
Fd 1 / ITS1 (10 µM)	2	1 µM
Rs 16 / ITS2 (10 µM)	2	1 µM
Taq polymérase (5 U/µl)	0,2	0,05 U/µl
H ₂ O pure	4,6	-
ADN	2	-
Volume final	20	-



➤ **Electrophorèse**

Les produits amplifiés sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% préparé dans du TAE 1X concentré et contenant du Bromure d'Ethidium (BET) à 0,5 µg/ml (voir annexe 9). Les puits du gel sont remplis de 2 µl de produit de PCR additionné de 2 µl du tampon de charge. La migration est réalisée tout d'abord à 50 V jusqu'à ce que les échantillons aient quitté leurs puits puis, le voltage est élevé à 70 V jusqu'à ce qu'ils aient atteint les trois quart du gel. L'électrophorèse terminée, le gel est révélé à l'aide d'un transilluminateur à UV (Uvitec, BTS-20MS, France) et les bandes d'ADN sont visualisées grâce au BET contenu dans le gel. Le BET est un colorant fluorescent possédant la propriété de s'intercaler entre les paires de base des acides nucléiques.

➤ **Séquençage**

Les produits issus de la PCR sont séquencés au Centre Universitaire Régional d'Interface (C.U.R.I) de Fès selon la méthode de Sanger en utilisant ABI 3130 (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant.

➤ **Analyse bioinformatique**

Les outils GenBank BLASTN sont utilisés pour l'analyse bioinformatique des séquences (<http://blast.ncbi.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLASPROGRAMS=megaBlast&PAGE&PAGETYPE=BlastSearch&SHOWDEFAULTS=on&LINKLOC=blasthome>).

Cette identification via la NCBI s'est basée sur une comparaison des séquences obtenues avec une base de données des séquences connues.

IV. Cinétique de croissance et de production de substance inhibitrice

La cinétique de croissance des isolats producteurs de substances inhibitrices dans le milieu de culture TSBYE est réalisée en mesurant la DO à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Selecta, France). Le suivi de la croissance est réalisé pendant 120 h à 30°C sous une agitation de 500 rpm, en même temps que celui de la production des substances inhibitrices selon la méthode des disques décrites auparavant utilisant *L. monocytogenes* comme souche indicatrice. En parallèle, des aliquotes du milieu de croissance sont prélevés pour réaliser le suivi du pH.

V. Caractéristiques physico-chimiques des substances antimicrobiennes



1. Caractéristiques physico-chimiques des substances anti-*Listeria*

1.1. Effet des enzymes protéolytiques

Afin de vérifier s'il s'agit ou non de substances antibactériennes de type protéique comme les bactériocines, les surnageants des souches productrices dotés d'une activité inhibitrice ont subi un traitement avec de la protéinase K (Merck, Germany). L'enzyme est additionné aux surnageants à une concentration finale de 1 mg /ml à pH 7 (Achemchem et *al.*, 2004). Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 h et l'activité inhibitrice est testée par la méthode de diffusion par disque décrite précédemment.

1.2. Stabilité au traitement thermique

Pour déterminer la thermo-résistance des substances antimicrobiennes produites, différentes fractions des extraits inhibiteurs sont soumises à un traitement thermique de 60°C pendant 30 min, de 80°C pendant 10 min et de 100°C pendant 5 min. Après refroidissement, l'activité de la substance inhibitrice sur *L. monocytogenes* est vérifiée par la technique de diffusion sur disque comme il a été décrit précédemment.

2. Stabilité au pH

Le pH optimal d'action de la substance antimicrobienne est mis en évidence par la variation du pH. Le surnageant bactériocinique est ajusté à des valeurs de pH variant de 4 à 10 avec des solutions stériles d'HCl (1 mole/l) ou de NaOH (1 mole/l). Après incubation pendant 1 h à 37°C, l'activité bactériocinogénique vis-à-vis de *L. monocytogenes* est ensuite testée par la méthode de diffusion sur disque comme il a été décrit précédemment.

VI. Caractérisation et purification partielles des substances inhibitrices : Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est la plus simple et la plus rapide des méthodes chromatographiques (Moore et Dalrymple, 1976). Elle utilise des phases stationnaires fixées sur des supports rigides maintenus verticaux dans une cuve à chromatographie contenant un solvant constituant la phase mobile (Hainque *et al.*, 2008).

➤ Préparation et dépôt des échantillons



Les surnageant des cultures bactériennes et levuriennes obtenus après 24 h ou 48 h d'incubation à 30°C dans le milieu TSAYE et Sabouraud respectivement, sont préalablement récupérés après centrifugation à 10000 tr/min pendant 20 min. Quelques µl de chaque échantillon sont déposés à intervalle régulier et de façon ponctuelle à l'aide de capillaires sur une ligne dessinée à une distance de 2 cm de l'extrémité inférieure de la plaque de silice (Fluka 60778, Germany). Plusieurs dépôts du même échantillon sont réalisés sur le même point, alternés par un séchage à l'aide d'un séchoir pour obtenir des produits séparés en grandes quantités. D'autre part, les milieux TSAYE et Sabouraud non ensemencés sont préparés de la même manière et sont déposés sur la même plaque. Ces derniers sont utilisés comme témoins négatifs. Deux répétitions sont réalisées.

➤ **Développement des plaques**

Les plaques ainsi préparées sont introduites dans la cuve préalablement saturée de vapeurs de solvants formant la phase mobile composée de n-butanol - éthanol - acide acétique - eau (30:70:5:20) (Li *et al.*, 2006). La migration est arrêtée lorsque le front du solvant atteint une distance de 1 cm du bord supérieur de la plaque.

➤ **Révélation**

Après migration, les plaques sont retirées de la cuve puis séchées à l'air libre. Sous la hotte, la première plaque est pulvérisée d'une solution de Ninhydrine à 0,3% (voir annexe 10). Elle est ensuite séchée à l'aide d'un séchoir pour laisser apparaître les protéines sous forme de tâches colorées.

La deuxième plaque, quant à elle, est soumise à un test d'activité antimicrobienne afin de révéler la tâche (donc la fraction de la culture) responsable de l'inhibition de la souche cible. Pour cela, la plaque est placée aseptiquement dans une boîte de pétri stérile et sur laquelle est coulée une couche mince de culture bactérienne cible. Après gélification, la boîte est incubée à 30°C pendant 24 h. Un résultat positif se manifeste par une zone d'inhibition sur la plaque. La détermination de la tâche inhibitrice est faite par comparaison des deux plaques. Le niveau de la plaque révélant une activité inhibitrice correspond à la tâche révélée par la ninhydrine.

I. Evaluation de la microflore des fromages affinés

La microflore est dénombrée pour tous les échantillons de fromages affinés étudiés. Le nombre de FMAT, de bactéries lactiques sur les milieux M17 et MRS et de champignons (moisissures et levures) est représenté dans la Figure 1. Les concentrations les plus faibles en microorganismes sont obtenues chez l'Emmental en comparaison avec les autres fromages. En effet, la FMAT a été de $2,2 \times 10^6$, $2,6 \times 10^7$, $1,6 \times 10^8$ et $3,1 \times 10^7$ UFC/g ; les teneurs moyennes en bactéries lactiques ont été de 1×10^6 ; $1,8 \times 10^6$; $3,8 \times 10^6$ et $1,3 \times 10^4$ UFC/g et enfin, les teneurs en champignons ont été de $9,2 \times 10^5$; 1×10^7 ; $2,3 \times 10^7$ et $9,4 \times 10^5$ UFC/g pour l'Emmental, le Saint Paulin, le Brie et le Bleu respectivement. Les fromages étudiés se sont avérés porteurs d'une flore microbienne.

Or, le lait, utilisé notamment dans la fabrication des fromages, est stérile dans les cellules de la mamelle de la vache ou autre animal producteur. Sa contamination peut avoir diverses sources comme les glandes mammaires, la peau de la mamelle, les moyens de traite, la qualité de l'air dans la ferme et les pratiques des éleveurs (Tolle, 1980). En plus, les fromages étudiés sont de différentes catégories et la microflore microbienne dépend essentiellement des conditions de la fabrication (procédé, conditions d'affinage, environnement de travail et hygiène de milieu). Cela explique les différences de concentrations de la charge microbienne dans les différents échantillons analysés. Cette différence de la charge peut aussi être due au milieu de culture utilisé.

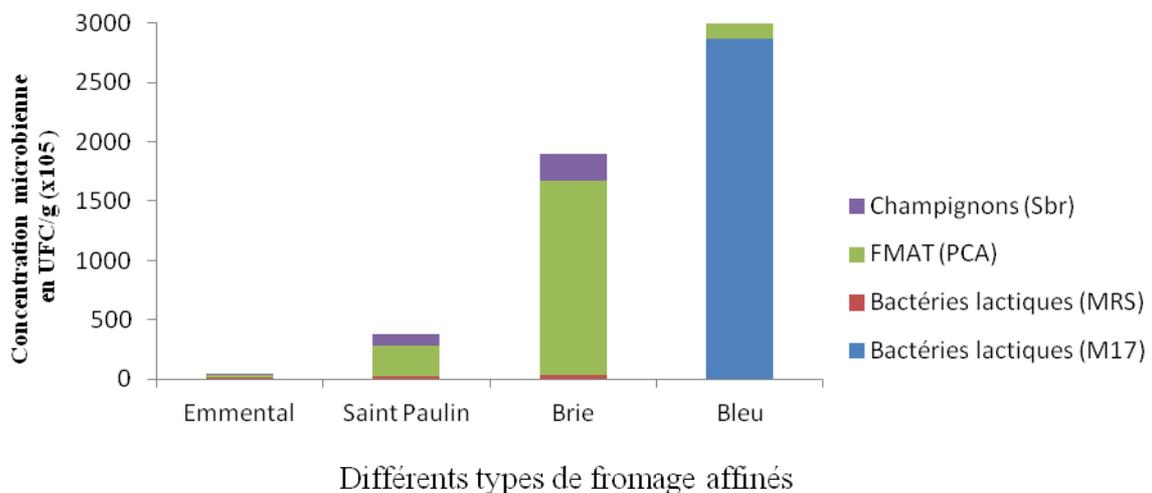


Figure 1 : Concentrations microbiennes en fonction du type de fromage

Dans cette étude, 113 isolats sont obtenus. Après plusieurs étapes de purifications successives, on a aboutit à 65 isolats à partir des quatre fromages étudiés (E pour Emmental, SP pour Saint Paulin, Br pour le Brie et Bl pour le bleu) (Fig.2).

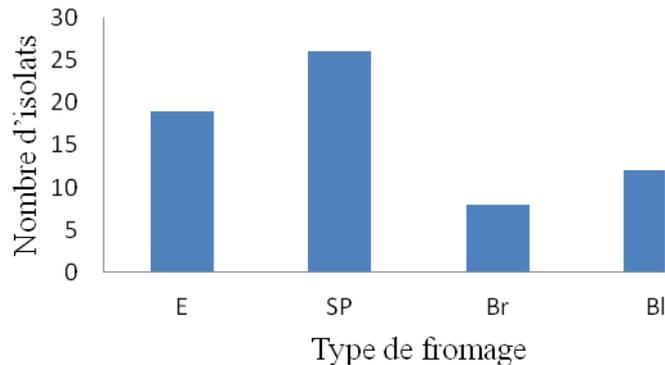


Figure 2: Nombre d'isolats par type de fromage

II. Mise en évidence des inhibitions vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*

La détection des isolats producteurs de substances antimicrobiennes vis-à-vis de *L.monocytogenes* a été réalisée par différentes méthodes. Tous les tests effectués ont été réalisés cinq à six fois et les résultats obtenus étaient reproductibles.

1. Technique de la double couche

Un suivi de l'activité antimicrobienne des isolats, par la méthode de double couche, a été réalisé dans le bouillon TSBYE. En excluant toute inhibition éventuelle qui pourrait être due à l'acidité ou à la production du peroxyde d'hydrogène.

Comme le montre le tableau 3, seules les activités anti-*Listeria* des isolats E2, Br4, E5 et Bl8 persistent aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. La meilleure activité apparaît au bout de 24h pour les isolats Br4, E5 et Bl8 et, au bout de 48h pour l'isolat E2. La faible activité anti-*Listeria*, des isolats 3, 7 et 10, notée dans les conditions aérobies, est totalement absente en anaérobiose.

On peut suggérer que la persistance de l'activité inhibitrice, dans différentes conditions, pour les isolats E2, Br4, E5 et Bl8, peut être liée à la synthèse d'une substance antimicrobienne par ces 4 isolats. Alors que pour les isolats 3, 7 et 10, l'activité anti-*Listeria*, observée en aérobiose est probablement due au peroxyde d'hydrogène. En effet, cette activité anti-*Listeria* disparaît en absence du peroxyde d'hydrogène dans les conditions anaérobies.



Tableau 3: Suivi de l'activité anti-*Listeria* par la méthode de la double couche au cours du temps

Isolats	Suivi d'activité en aérobiose				Suivi d'activité en anaérobiose			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
1	+	-	-	-	+	-	-	-
2	+	++	+	+	+	++	+	-
3	++	+	+	-	-	-	-	-
4	++	++	+	-	++	+	+	-
5	++	+	+	-	+	+	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	+	+	-	-
9	+	+	-	-	+	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-

+ : inhibition

- : pas d'inhibition

2. Technique des disques

Avant élimination de l'effet inhibiteur des acides organiques, un total de 15 % des isolats (10 sur les 65 retenus) a montré une activité inhibitrice (Fig. 3a).

Après élimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène, seule l'activité des quatre isolats (E2, Br4, E5 et B18) persiste (Fig. 3b et 3c). Les diamètres optimaux d'inhibition (tableau 4) sont de 5,8, 2,96, 1,33 et 1,6 mm pour les isolats E2, Br4, E5 et B18 respectivement. Après cet optimum, on constate une chute de l'activité inhibitrice (Fig. 4).

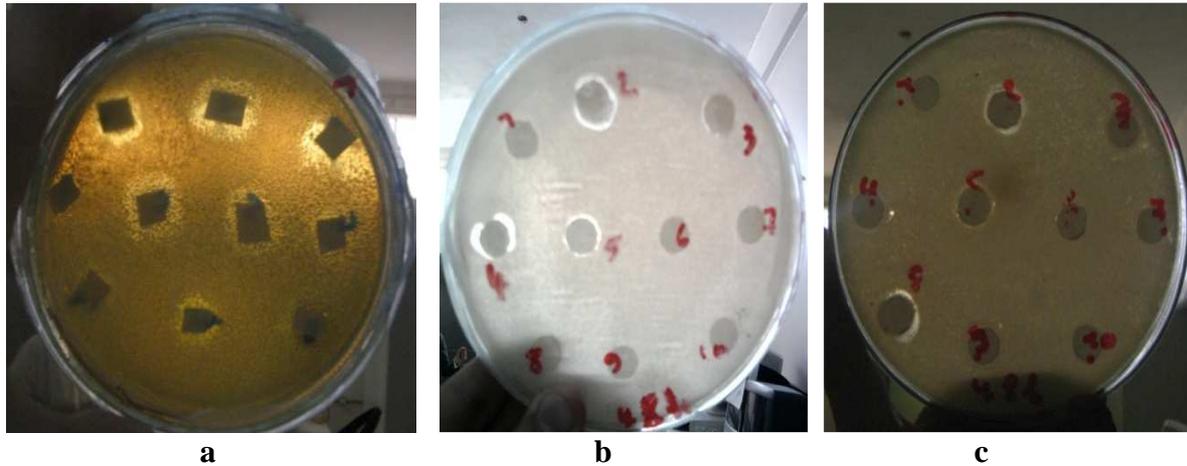


Figure 3. Activité antimicrobienne de 10 isolats vis-à-vis de *L.monocytogenes* par la méthode de diffusion des disques, a : avant neutralisation des surnageants, b et c : après neutralisation.

Tableau 4. Zones d'inhibition en fonction de temps d'incubation dans bouillon TSB à 30°C sous faible agitation

Temps Isolats	24h	48h	72h	96h
2				
4				
5				
8				

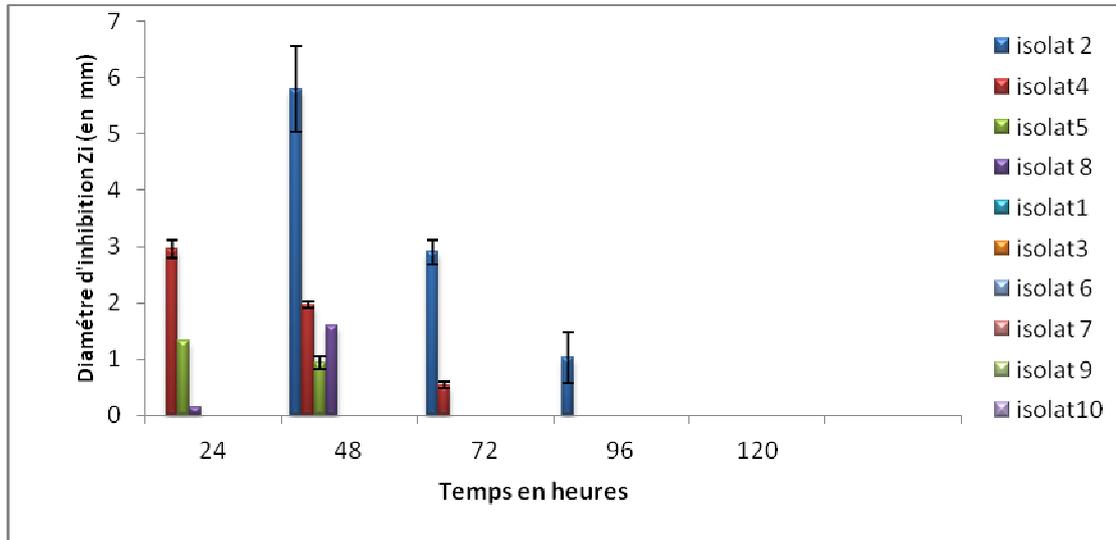


Figure 4. Evolution du diamètre d'inhibition des isolats en mm vis-à-vis de *L.monocytogenes* en fonction du temps d'incubation

3. Technique des puits

Aucun des isolats étudiés n'a révélé un effet antimicrobien contre la souche cible, *L.monocytogenes* par cette méthode. On peut justifier ces résultats négatifs par l'envahissement de *L.monocytogenes* de la boîte et même des zones de dépôt du surnageant (de la culture des isolats inhibiteurs) avant que ce dernier ne diffuse complètement dans la gélose. Ceci peut s'expliquer également par le fait que la concentration de la substance inhibitrice dans le volume déposé dans le puits est peut être insuffisante.

III. Identification des isolats producteurs de substances anti-*Listeria*

1. Identification phénotypique

L'examen macroscopique des quatre isolats E2, Br4 et E5 est regroupé dans le tableau5.

Tableau 5. Aspect macroscopique des quatre isolats producteurs de substances bioactives

Isolat	E2	Br4	E5	Bl8
Aspect macroscopique	Petites colonies rondes, lisses, demi-bombées, opaques et de couleur jaune.	Petites colonies rondes, blanchâtres, lisses et demi-bombées.	Grandes colonies irrégulières, avec un centre surélevé et creux, muqueuses, blanche crème	Petites colonies plates, d'aspect poudreux, blanches et vert après 3-4j d'incubation

L'examen microscopique à l'état frais a permis un triage initial des isolats. Il a révélé que les trois isolats E2, Br4 et E5 sont des bactéries. La coloration de Gram a révélé des coques, Gram positif groupés en amas ou en chaînes pour l'isolat E2 ; en amas, pour l'isolat Br4 et ; des bacilles unicellulaires Gram négatif pour l'isolat E5. Quant à l'isolat B18, il est sous forme de filaments mycéliens septés avec une organisation en pinceaux, qui portent des conidiophores ramifiés et des conidies unicellulaires, globuleuses et verdâtres (apparaissant très claire au microscope) (Fig. 5b).

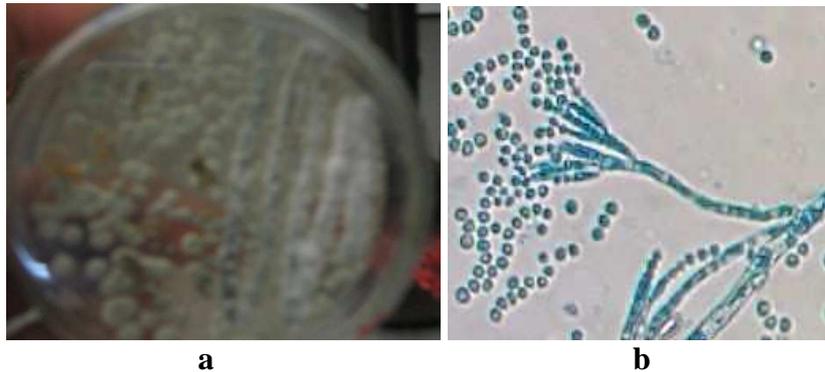


Figure 5. Observation des cellules de *Penicillium*. a : macroscopique ; b : microscope

2. Identification biochimique des bactéries

Les tests d'identification biochimique que nous avons utilisés se basent sur l'aptitude des isolats à croître dans différentes conditions de température, salinité, ainsi que sur leur capacité à dégrader certains sucres. Le profil biochimique de ces isolats est présenté dans le tableau 6.

Les isolats E2 et Br4 sont catalase positif et oxydase négatif. L'isolat E5 est catalase négatif et oxydase positif. De plus, les trois isolats ne sont pas producteurs de gaz (CO₂). Ils poussent à des températures de 30, 45 et 60°C, sont mésophiles à faiblement thermophiles. Les trois isolats tolèrent des fortes concentrations de NaCl 2, 4 et 6,5%.

Le profil biochimique des trois bactéries E2, Br4 et E5 est caractérisé par le métabolisme de plusieurs substrats glucidiques (glucose, lactose, mannitol, sucrose, ribose, xylose, galactose et le fructose). À l'exception de l'arabinose que les trois isolats sont incapables de fermenter, tous les sucres sont dégradés par les trois souches. Le citrate est métabolisé par tous les isolats, alors que l'isolat Br4 n'hydrolyse pas l'arginine.

L'ensemble de ces résultats, en se référant à la classification de "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", nous permet de suggérer que l'isolat E2 appartient au genre *Micrococcus*, l'isolat Br4 au genre *Staphylococcus* et l'isolat E5 au genre des *bacillus*.



Une caractérisation génotypique s'avère néanmoins nécessaire pour une identification plus approfondie (Tableau 6).

L'isolat B18 est incapable de se développer à une température au-dessus de 35°C et tolère une atmosphère appauvrie en oxygène. Il croit sur milieu acide (Sabouraud de pH 5), et tolère de fortes concentrations de NaCl. En se basant sur les résultats obtenus à partir de ces tests et par comparaison avec les données de la littérature (Botton *et al.*, 1990 ; Chermette et Bussieras, 1993 ; Thom et Curie, 1993), on peut suggérer que la moisissure appartient au genre *Penicillium*.

L'isolat B18 provient de l'échantillon de fromage "Bleu Formital" obtenu par ensemencement avec *Penicillium roquefortie*. Ceci nous permet de suggérer que l'isolat B18 correspond à *P. roquefortie*.



Tableau 6. Etude phénotypique et **biochimique des trois isolats bactériennes**

Isolats		E2	Br4	E5
Type fermentaire	Oxydase	-	-	+
	Catalase	+	+	-
	Gaz /H ₂ S	-/-	-/-	-/-
	Citrate	+	+	+
	VP	+	-	-
	RM	-	+	+
Fermentation des sucres	Glu /Lac	+/+	+/-	+/-
	Monnitole	+	+	+
	Sucrose	+	+	+
	Ribose	+	+	+
	Xylose	+	+	+
	Arabinose	-	-	-
	Galactose	+	+	+
	Fructose	+	+	+
Température	10°C	IND	IND	IND
	30°C	+	+	+
	45°C	+	+	+
	60°C	-	+	+
NaCl	2%	+	+	+
	4%	+	+	+
	6,5%	+	+	+
Type respiratoire		Aéro/ anaérobie	Anaérobie facultatif	Aéro/ anaérobie
Test de mobilité		-	-	-
Hydrolyse d'arginine		+	-	+

+: réaction positive. - : réaction négative. IND : indéterminé

3. Identification moléculaire

L'amplification des séquences du gène ARN 16S, en utilisant les couples d'amorces Fd1/RS16 et IST1/IST4, a abouti à des bandes visualisés par UV après leurs migration électro-phorétique sur gel d'agarose (figure 6).

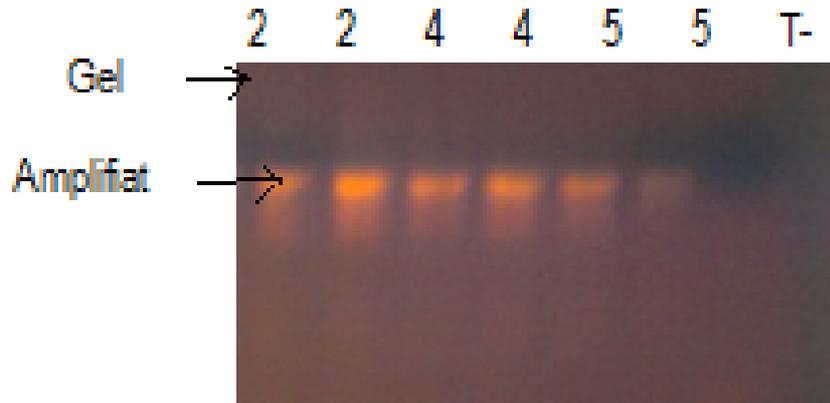


Figure 6. Amplification des séquences de gène ARNr 16S des isolats E2, Br4 et E5

Les chromatogrammes (voir annexe 9) sont obtenus après séquençage des produits de la PCR selon la méthode de Sanger. Des séquences sens/anti-sens, établit après l'analyse de chromatogramme, ont fait l'objet d'une comparaison à d'autres séquences procaryotiques dans la base de donnée Genbank à l'aide du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Ce programme permet d'établir le pourcentage d'identité de nos isolats avec les espèces les plus proches (tableau 15, annexe 9). Le tableau 7 récapitule les espèces trouvées avec le pourcentage d'homologie.

Le séquençage des isolats E2, Br4 et B18 est en cours.

Tableau 7: Espèces trouvées après l'analyse par le BLASTn

Isolat	Espèce	Pourcentage d'identité
E2	séquençage en cours	
Br4	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100%
E5	séquençage en cours	
B18	Faux séquençage	

Le *Staphylococcus pasteurii* est parmi les espèces du genre *staphylococcus* qui sont très rarement isolées et dont l'identification s'avère difficile (Revue Française des Laboratoires, 2002). C'est une espèce à coagulase-négative, non pathogène pour l'homme.



Elle fait partie des bactéries les plus fréquentes dans les écosystèmes fromagers (Irlinger, 2008) surtout au début d'affinage (Brennan *et al.*, 2002).

En raison de leur caractère halotolérant (croissance à une concentration en NaCl de 6,5%), les conditions d'affinage constituent une niche écologique favorable à leur implantation. Leur origine peut être soit le lait de vache (Rather *et al.*, 1986 ; Ben Hassen *et al.*, 2000 ; Bjorland *et al.*, 2005), soit le manipulateur via les squames de peaux.

Concernant leur activité inhibitrice, il a été démontré par Fleurette (1990) que les *Staphylocoques pasteurii* produisaient des substances bactériolytiques et des bactériocines.

IV. Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrice

La cinétique de croissance a été déterminée en suivant la densité optique de la culture à 620 nm à différents intervalles de temps, de 4h à 120h. Un suivi de la production de substances anti-*Listeria* a été déterminé par la technique des disques et un suivi de l'acidification de milieu de culture ont été réalisés simultanément.

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les quatre isolats sélectionnés présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, et elles atteignent respectivement leur phase stationnaire au bout de 24 heures d'incubation. A l'exception de la souche B18, dont la phase stationnaire est tardive (48h). La phase de croissance exponentielle est marquée par une légère acidification du milieu de culture pour les 4 isolats (Fig.7).

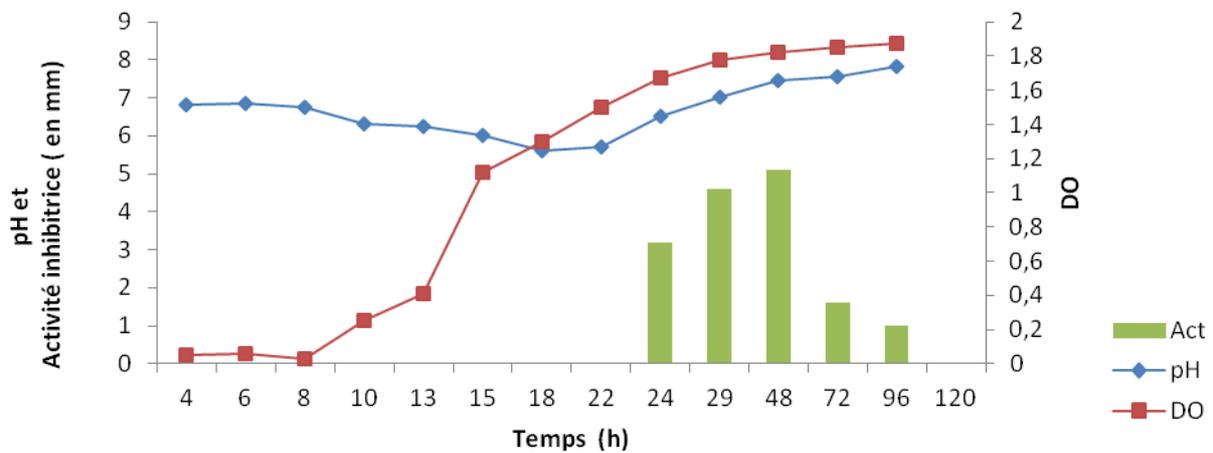
On a constaté également que la sécrétion des molécules antagonistes pour les isolats n'a pu être détectée qu'à la fin de la phase de croissance exponentielle (pour les isolats E2, Br4 et E5). Cette phase correspond à la phase de synthèse des substances inhibitrices par les cellules productrices dans le milieu extracellulaire (Carine et Thonart, 2009). Le niveau maximum de production est atteint pour un pH compris entre 6 et 7, pour les mêmes isolats. A l'inverse, la production des substances inhibitrices par l'isolat B18 commence au cours de la phase de croissance exponentielle. L'activité inhibitrice atteint son niveau maximal 5.1, 2.5, 1.6, et 1.6 mm après 48, 24, heures d'incubation respectivement pour les souches E2, Br4, E5 et B18. Cette activité diminue progressivement au cours du temps (Fig.7).

La baisse d'activité peut s'expliquer par l'action des protéases produites durant la phase stationnaire, ou alors par l'adsorption de l'agent antimicrobien à la surface du germe producteur (Gálvez *et al.*, 1989 ; Savijoki *et al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009). Ces auteurs ont constaté que lorsque la période d'incubation se prolongeait, l'activité inhibitrice des

microorganismes (levures ou bactéries) devenait faible ou pouvait même disparaître. Ce qui peut être expliquée par la réduction de la biomasse cellulaire, l'épuisement des nutriments ou par la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires pouvant causer la dégradation des molécules bioactives. Une alternative pour éviter cette perte d'activité c'est d'immobiliser les germes d'intérêt dans des billes d'alginate afin d'augmenter la durée et la stabilité de la production des antimicrobiens (Scannell *et al.*, 2000 ; Pongtharangkul *et al.*, 2006).

La faible acidification du milieu de culture, peut être expliquée par une libération des acides organiques issus des voies fermentaires pendant la phase exponentielle de croissance. Tandis que la légère augmentation du pH pendant la phase stationnaire est probablement due à la dégradation des sources azotées. Les travaux de Barefoot et Klaenhammer (1984), ont montré que la sécrétion de bactériocines est fortement dépendante du pH du milieu de production et qu'un pH autour de 6,5 favorisait cette sécrétion. Nos résultats semblent aller dans ce sens dans la mesure où l'activité inhibitrice des trois isolats E2, Br4, et E5 apparaît lorsque le pH est aux alentours de 6.

Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrices de l'isolat E2



Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrices de l'isolat

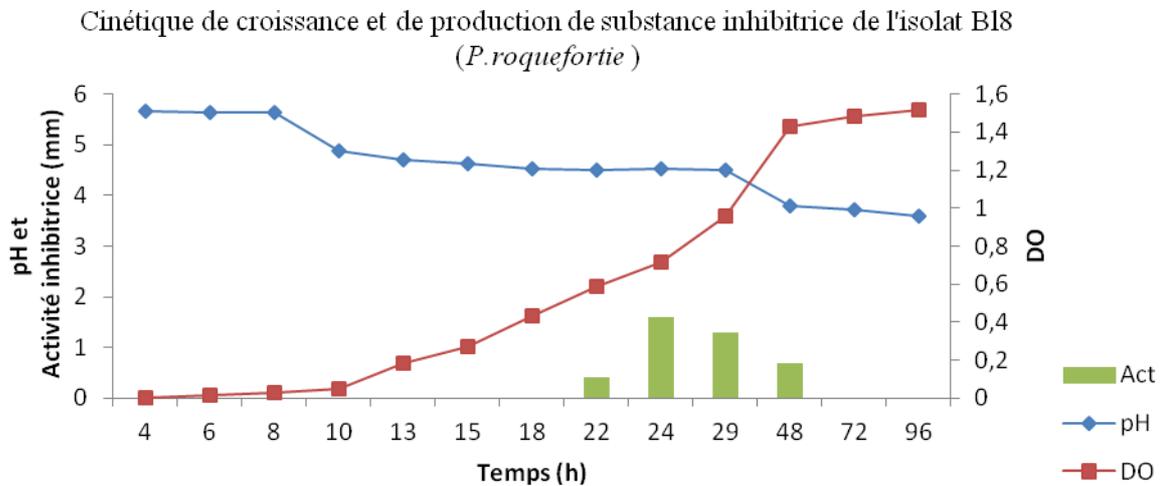
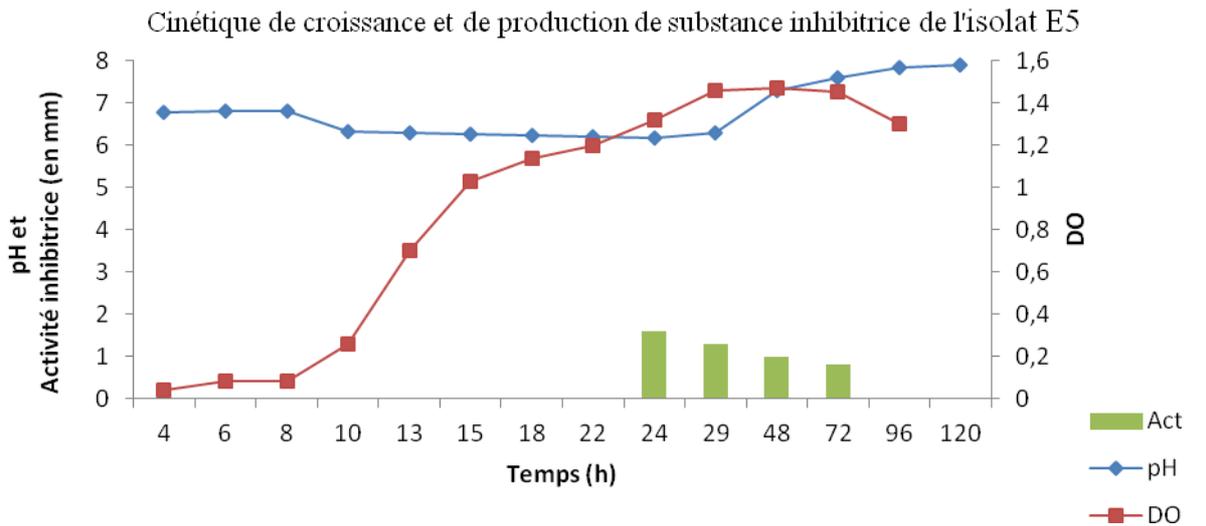
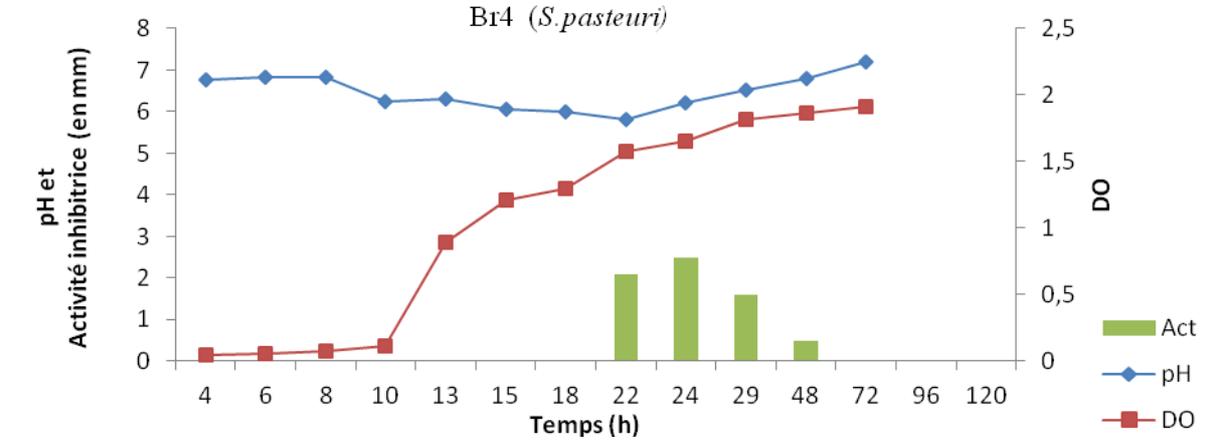


Figure 7. Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrices



V. Caractéristiques physico-chimiques des substances antagonistes

1. Effet des enzymes protéolytiques

L'activité antimicrobienne est entièrement détruite pour les isolats E2, Br4 et E5 sous l'action de la protéase. A l'inverse, l'isolat B18 préserve son activité inhibitrice après traitement par la même enzyme. Ces résultats suggèrent que la partie biologiquement active des substances produite par les isolats E2, Br4 et E5 est de nature protéique. Par contre, il semble être de nature non protéique ou posséder des fractions non protéiques (responsables de l'activité inhibitrice) dans le cas de l'isolat B18.

2. Stabilité au traitement thermique

La substance bioactive de l'isolat E5 a montré une résistance à la chaleur, même avec un traitement à 100°C durant 5 min. Cependant, les substances antagonistes des isolats E2 et Br4 ont été moins résistantes à la chaleur (perte d'activité après chauffage à 100°C durant 5 min) alors que celle de la souche B18 est totalement détruite après traitement à 60, 80 et 100°C (tableau 8). Comme, il s'agit dans ce dernier cas d'une moisissure, et étant donné la nature non protéique de cette substance et sa thermosensibilité, on peut dire qu'il s'agit probablement d'un antibiotique. Davet et Rouxel (1997) ont déjà montré que la plupart des antibiotiques sont thermolabiles et qu'un traitement à la chaleur les dénaturerait.

Tableau 8 : Stabilité thermique de l'activité anti-Listeria

Traitement Isolats	Température		
	60°C	80°C	100°C
Isolat 2	+	+	-
Isolat 4	+	+/-	-
Isolat 5	+	+	+
Isolat 8	-	-	-

+ : Inhibition

- : Pas d'inhibition



3. Stabilité pendant la conservation

Les souches étudiées conservent leur activité anti-*Listeria* après conservation pendant 4 semaines à une température de 4°C et pendant 11 semaines à -20°C. Ces caractéristiques confèrent à ces substances un grand intérêt biotechnologique dans le cas de leur utilisation dans la bioconservation des aliments réfrigérés ou bien congelés.

4. Stabilité au pH

Les molécules antagonistes des isolats E2 et Br4 ont préservé leur stabilité à des pH acides (4 et 6). Une perte remarquable de cette stabilité a été détectée à des pH alcalins (9 et 10). La substance antagoniste de l'isolat E5 a conservé son activité après avoir été soumise à un pH 9 (tableau 9). Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs (Bogovic *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1998; Frenandez-Murga *et al.* 2000; Hilali *et al.* 2002; Kumar *et al.* 2006). Dans le même sens, le pH optimal de la nisine est 3 (Rollema *et al.* 1995).

Ces caractéristiques confèrent à ces substances antimicrobiennes un grand intérêt biotechnologique dans le cas de leur utilisation dans la bioconservation des aliments.

Tableau 9 : Stabilité des substances antagonistes vis-à-vis de pH

Souche	pH			
	4	6	9	10
2	+	+	-	-
4	+	+	-	-
5	+	+	+	-
<i>P. roqueforti</i>	+	-	-	-

+ : Inhibition - : Pas d'inhibition

VI. Séparation et caractérisation préliminaires des substances antagonistes par chromatographie sur couche mince

Le chromatogramme révélé par la ninhydrine (Fig.8) montre deux spots de différence entre le témoin négatif et les surnageant des cultures étudiées (isolats E2, Br4, E5 et B18).

Les trois spots témoin sont dans les mêmes lignes de migrations avec trois spots de surnageant testés. Les rapports frontaux obtenus après migration sont regroupés dans le tableau 10. Ils sont calculés selon la relation :

Rf = Distance parcourue par une substance (d) / Distance parcourue par l'éluant (D)

Les valeurs présentées dans le tableau présentent la moyenne de deux essais. La valeur de D = 7,2cm.

L'activité anti-*Listeria* des spots obtenus n'affiche aucune inhibition. Par ailleurs, des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer le poids moléculaire de ces substances bioactives.

Tableau 10 : Rappports frontaux des surnageant des souches étudiés.

Isolats	Spots	Rappports frontaux
2	5	0,18 ; 0,42 ; 0,5 ; 0,64 ; 0,72
4	5	0,18 ; 0,42 ; 0,5 ; 0,61 ; 0,72
5	5	0,16 ; 0,42 ; 0,5 ; 0,65 ; 0,72
8	5	0,16 ; 0,43 ; 0,5 ; 0,63 ; 0,71
Témoin	3	0,2 ; 0,5 ; 0,7

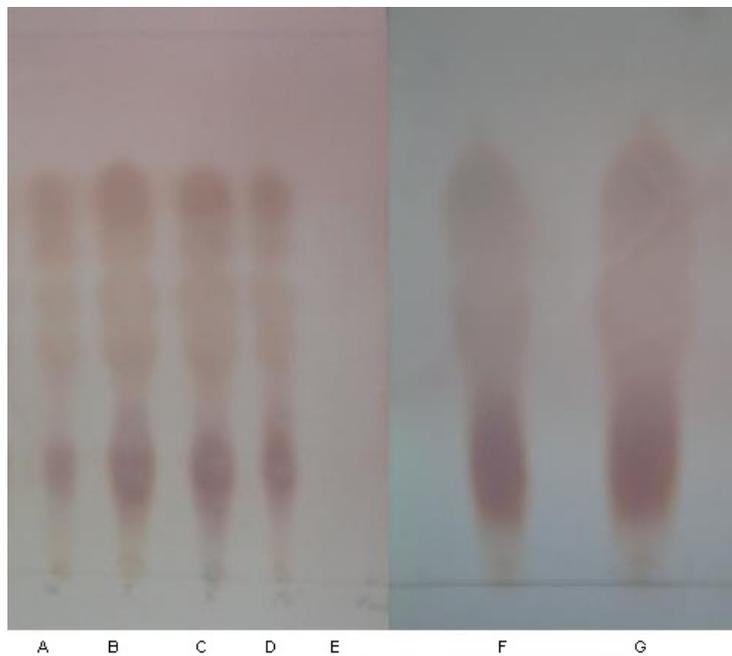


Figure 8. Chromatogramme obtenu après révélation à la ninhydrine. A) surnageant de la culture 2 ; B) surnageant de la culture 4 ; C) surnageant de la culture 5 ; D) surnageant de la culture 8 ; E) antibiotique vancomycine ; F et G) surnageant des témoins.



CONCLUSION GÉNÉRALE

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par certaines souches de bactéries et dont beaucoup ont une activité contre des bactéries pathogènes tels que *L. monocytogenes*. Ces bactériocines ont des atouts indéniables pour représenter une technologie douce de préservation des aliments. Cependant, leur utilisation est soumise à de nombreuses contraintes. Celles-ci sont liées principalement à la production, à la souche productrice, au conditionnement, au produit à conserver et à la législation en vigueur pour les bactériocines considérées jusqu'à présent comme des additifs alimentaires.

Dans le présent travail, 65 souches ont été isolées à partir de quatre types de fromages affinés (Bleu Formital, Brie, Emmental et Saint Paulin). La méthode de diffusion par disque a permis de montrer un effet inhibiteur de quatre isolats vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans des conditions excluant l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène. L'identification de ces quatre isolats (E2, Br4, E5 et B18) par l'approche classique et moléculaire a permis d'en identifier deux : *Staphylococcus pasteurii* Br4 et *Penecillium roqueforti* B18.

Les substances produites par E2, Br4 et E5 sont sensibles au traitement protéolytique, contrairement à celle de *Penecillium roqueforti* B1 qui ne semble pas être de nature protéique. Leur stabilité vis-à-vis du pH et de la température s'avère importante. De même que la conservation pendant plusieurs semaines à -20°C ne semble pas affecter l'activité inhibitrice.



PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans ce mémoire permettent à tout au moins de fournir un ordre d'idée plus clair sur la potentielle anti-*Listeria* de souches isolées à partir de fromage affiné. Les trois souches sélectionnées représentent une voie d'avenir pour la production des substances anti-*Listeria* utilisées dans la fermentation et la bio-conservation des aliments. L'optimisation des conditions de production des substances à activité inhibitrice et l'analyse de leurs propriétés physico-chimiques permettra une meilleure caractérisation de ces substances pourra servir de base pour orienter les futurs travaux de recherches sur la production de bactériocines pour une éventuelle application agroalimentaire.



Aasen I., 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 159-166.

Ammor M.S., Flórez A.B., Margolles A., Mayo B., 2006. Fluorescence spectroscopy: a rapid tool for assessing tetracycline resistance in *Bifidobacterium longum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 740-746.

Ananou S., Baños A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E., 2010b. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control.*, 21: 478–486.

Ananou S., Baños A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E., 2005a. *International Journal of Food Microbiology.*, 103: 179-190.

Ananou S., Baños A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E., 2005b, *Meat Science* 71, 549-556.

Ananou S., Baños A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Valdivia E., 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods.

Ananou S., Garriga M., Jofré A., Aymerich T., Gálvez A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Valdivia E., 2010a. Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Science* ., 84 : 594–600.

Barefoot S.F., Klaenhammer T.R., 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 26:328–334.

Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal.*, 11: 259–274.

Bertrand F., 1988. Le fromage grand oeuvre des microbes .*Revue générale de froid.*, 78 :519-527.

Bierbaum G., and Sahl H.G., 2009. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol.*, 30: 317-327.

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier., 1990. *bulgaricus*. *J Bacteriol.*, 16 : 3 2 1-325.



Boubendir A., Hamidechi M. H., Mostakim M., El Abed S., Ibensouda Koraichi S., 2011. Incidence de *Listeria* spp. et autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin dans le Nord Est Algérien. *Revue Méd. Vét.* 162, 5, 265-269.

Budde B.B., Hornbæk T., Jacobsen T., Barkholt V and Koch A.G., 2003. *International Journal of Food Microbiology.*, 83, 171-184.

Chaves-López C., De Angelis M., Martuscelli M., Serio A., Paparella A., et Suzzi G., 2006. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology.*, 101 : 353-360.

Chermette R., Bussieras J., 1993. *Parasitologie vétérinaire. Mycologie.*

Dahl S., Tavaría F. K., et Malcata F. X., 2000. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening: production of volatile sulfur compounds (MTL, DMDS, DMTS). *International Dairy Journal.*, 10: 255-262.

Davet P., Rouxel F. (1997). *Détection et isolement des champignons du sol.*

De Roissart H., et Luquet F.M., 1986. *Les bactéries lactiques.* Uriage, Lorica, France., 1 : 1-286.

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., et Ross P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16 : 1058-1071.

Deetae P., Bonnarme P., Spinnler H. E., et Helinck S., 2007. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Applied microbiology and biotechnology.*, 76: 1161-1171.

Deetae P., Spinnler H. E., Bonnarme P., et Helinck S., 2009. Growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter* sp. during ripening in a cheese model medium. *Applied microbiology and biotechnology.*, 82: 169-177.

Devuyest L and Vandamme E.J., 1994. *Bacteriocines of lactic acid bacteria.* London: academic and professional. 91-146.

Diep D.B and Nes I.F., 2002. *Current Drug Targets* 3:107-122.

Dortu C and Thonart P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy. Society and Environment.* 13 :143-154.

Dortu C et 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.



Fimland G., 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.*, 182: 2643- 2648.

Franz C., Van Belkum MJ., Holzapfel WH., Abriouel H and Galvez A., 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. 31:293-310.

Gomes A. M., Malcata Y. F., et Claver F. A., 1998. Growth enhancement of bifidobacterium. *Journal of Dairy Science.*, 81: 1817-2825.

Guerzoni M. E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., et Suzzi G., 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology.*, 69: 79-89.

Hainque B., Bandin B et Lefebvre P., 2008. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Chapitre 15 :Chromatographie planaire. Flammarion.

Hilali L., Khatabi A., Nsarlah N., Malki A., et Finance C., 2002. Isolement des nouvelles souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotechnol.*, 2: 49-53.

Joerger M.C and Klaenhammer T.R., 1986. *Journal of Bacteriology* 167: 439-446.

Klaenhammer T.R., Barrangou R., Logan Buck B., et Azcarate-Peril M.A., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 393-409.

Kovacs L.G., ballati P.A., Kroshman H.B., et Pueppke, S.G., 1995. Transcriptional organisation and expression of nol XWBTUV. A locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol. Microbiol.*, 17: 923-933.

Li Q.Q., Meng X.Y., Wu X., Lin W., Duan C.J., Feng J.X., 2006. Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* Strain B11 and their properties. *Agricultural Sciences in China.*, 5: 363-369.

López-Lara L., Gálvez A., Martínez-Bueno M., Maqueda M and Valdivia E., 1991. *Canadian Journal of Microbiology*. 37 : 769-774.

Lücke F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meats. *Meat Science.*, 56: 105–115.



Maqueda M., Gálvez A., Martínez-Bueno M., Sánchez-Barrena M.J., González C., Albert A., Rico M., et Valdivia E., 2004. Current Protein and Peptide Science., 5:399-416 .

Mataragas M., Drosinos E.H., Tsakalidou E., et Metaxopoulos J., 2004. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 85: 191-198.

McAuliffe O., Hill C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 285-308.

Moore., Dalrymple., 1976. Experimental methods in organic products chemistry. Second edition. London, Toronto., 50-60.

Morales P., Fernández-García E., et Nuñez M., 2003. Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology.*, 37: 410-414.

Moretro T., Aasen I.M., Storro I., Axelsson L., 2000. Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.*, 88(3): 536-545.

Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J., Dicks L.M., 2001. Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 1131-1138.

Nes I.F., Diep D.B., Holo H., 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189-1198.

Nigutova K., 2007. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA 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.

Papagianni M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21(6): 465-499.

Pfeiler E.A. and Klaenhammer T.R., 2003. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* 12: 546-553.

Piard J.C., Desmazeaud M.J., 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.*, 72: 113-142.



Pongtharangkul T., Demirci A., 2006. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol. Prog.*, 22: 217-224.

Prescott L.M., Harley J.P., Donald A., 2003. *Microbiologie*, De boeck université, 2eme édition française., 128 : 28-29.

Ratray F.P., Fox P.F., 1999. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: A Review. *Journal of dairy science* 82: 891-909.

Rogers LA., 1928. The inhibitory effect of *Micrococcus lactis* on *Lactobocilus*.

Rollema H.S., Kuipers O.P., Both P., De Vos W.M., Siezen R.J., 1995 Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl Environ Microbiol* 1 : 2873-2878.

Ryan M.P., Jack R.W., Josten M., Sahl H.G., Jung G., Ross, R.P., Hill C., 1999. Extensive post-translational modification, including serine to D- alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *J. Biol. Chem.* 274:37544-37550.

Sable S., Letellier F et Cottenceau G., 1997. An analysis of the volatile flavour compounds in a soft raw goat milk cheese. *Biotechnology Letters.* 19: 143-146.

Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 394-406.

Scannell A.G., et al., 2000. Continuous production of lactacin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 573-579.

Stiles M. E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 70: 331–345.

Stiles M.E., Holzappel W., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36(1): 1-29.

Suzzi G., Lanorte M. T., Galgano F., Andrighetto C., Lombardi A., Lanciotti R., Guerzoni M.E., 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology.*, 69, 69-77.

Ten Brink B., Minekus M., Vander Vossen J.M., Leer R.J., Huis In't Veld J.H.J., 1994. Antimicrobial activity of Lactobacilli: preliminary characterisation and optimisation of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 140–148.



Thom C., Currie J.N., 1913. - The dominance of Roquefort mold in cheese. *Journ. Biol. Chem.*, 15: 249-258.

Todorov S.D., Dicks L.M., 2004. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic Microbiol.*, 44: 305-316.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Kersters K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60: 407.

Verluyten J., Leroy F., De Vuyst L., 2004. Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5081-5088.

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

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

Weisberg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 679-703.

Wessels S., Jelle B and Nes I., 1998. Reports of the Danish Toxicology Centre, Denmark.

Willey J.M., van der Donk W.A., 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology.*, 61: 477-501.

Wilson A.R., Sigee D. et Epton H.A.S. (2005). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.*, 99: 1516-1522.

Tolle., 1980. **Brennan et al.,** 2002. **Rather et al.,** 1986. **Ben Hassen et al.,** 2000. **Bjorland et al.,** 2005. **Ennahar et al.,** 2003. **Arfie et al.,** 2003. **Frenander M et al.,** 2000.

Siswanto HP., Gratadoux JJ., Richard J., 1996. Potentiel inhibiteur de la souche de *Brevibacterium linens* productrice de la linenscine OC2, vis-à-vis des *Listeria* et de *Staphylococcus aureus*. Elsevier/INRA., 76 :501-512.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

