

**République Algérienne Démocratique et Populaire.**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.**

**Université A/MIRA de Béjaia.**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.**

**Département de Microbiologie.**

**Mémoire**

**En vue de l'obtention du diplôme de**

**Magister**

**En Microbiologie Appliquée.**

**Thème :**

**Effets antibactériens des lactocoques à  
l'égard de *Staphylococcus aureus*  
multi-résistant**

**Soutenue le    /    / 2009**

**par : Melle KERAMANE Badria**

**Devant le jury composé de :**

<b>M<sup>r</sup> BENALLAOUA S.</b>	<b>Professeur à l'Université A/ MIRA de Béjaia</b>	<b>Président</b>
<b>Mme SADOUN D.</b>	<b>Professeur à l'Université A/ MIRA de Béjaia</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M<sup>r</sup> IGUEROUADA M.</b>	<b>Maitre de conférences à l'Université de Béjaia</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>r</sup> KECHA M.</b>	<b>Maitre de conférences à l'Université de Béjaia</b>	<b>Examineur</b>

**2008 /2009**

## *REMERCIEMENTS*

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude à mon directeur de mémoire M<sup>me</sup> Sadoun D., Professeur à l'université A. Mira de Béjaia, pour ses conseils éclairés et ses encouragements tout au long de la réalisation de ce travail, et aussi pour sa confiance, sa tolérance et sa compréhension.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Mr. Benallaoua S. Professeur à l'université A. Mira de Béjaia qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Mes remerciements s'adressent également à Mr. Kecha M., Maître de conférences à l'université A. Mira de Béjaia, et Mr. Iguerouada M. Maître de conférences à l'université A. Mira de Béjaia, qui ont accepté de juger ce travail, et de faire part de leurs remarques, reconnues judicieuses, qui ne feront que rehausser la qualité de ce mémoire.

Mes remerciements sont également Adressés à

Mr Bouyahya A.H. Docteur vétérinaire pour sa coopération et sa disponibilité.

M<sup>lle</sup> Titeli F., pour son aide précieuse et ses orientations.

M<sup>lle</sup> Bendali F., pour nous avoir servie d'exemple et pour ses précieux conseils.

Mr Belhadi D., Mme feradji S., Mr Ben djeddou K., Mme Garout A., Mr Sadoun B. Pour leurs conseils et leur soutien pendant la réalisation de ce travail.

Enfin, un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) et tout particulièrement à mes collègues et amies : Firdaousse, Samiha, Betitra, Ibtisseme et Fahima, pour leur soutien et leur esprit d'équipe, et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ou qui m'ont encouragé et soutenu à tout moment.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Arbre d'évolution phylogénique des bactéries Gram positif .....	4
<b>Figure 2</b> : Observation au microscope électronique à contraste de phase de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i> .....	6
<b>Figure 3</b> : Métabolisme du lactose, glucose et galactose chez <i>Lc. lactis</i> .....	9
<b>Figure 4</b> : Principaux mécanismes de génération du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par les bactéries lactiques .....	12
<b>Figure 5</b> : Destruction cellulaire par formation de pores par des lantibiotiques .....	16
<b>Figure 6</b> : Formation des pores selon modèle « Wedge » récepteurs-indépendant.....	17
<b>Figure 7</b> : Inhibition de la biosynthèse de la paroi .....	18
<b>Figure 8</b> : Formation des pores par les bactériocines de la classe II.....	20
<b>Figure 9</b> : Micrographie électronique et coloration de Gram de <i>S. aureus</i> .....	22
<b>Figure 10</b> : Mécanisme de pathogénicité d'une intoxication due à une entérotoxine Staphylococcique .....	26
<b>Figure 11</b> : Mécanisme d'action d'un superantigène d'une entérotoxine Staphylococcique .....	27
<b>Figure 12</b> : Isolement et purification des souches de lactocoques à partir de laits de vaches et de chèvres .....	33
<b>Figure 13</b> : Standardisation des inocula de lactocoques.....	40
<b>Figure 14</b> : Standardisation de l'inoculum de <i>S. aureus</i> .....	41
<b>Figure 15</b> : Test des spots.....	44
<b>Figure 16</b> : Culture mixte de <i>S. aureus</i> et de la souche de Lactocoque retenue.....	48
<b>Figure 17</b> : Etapes de fabrication du fromage frais inoculé avec <i>S. aureus</i> multi-résistant et la souche de Lactocoque retenue.....	50
<b>Figure 18</b> : Observation microscopique d'une des souches de <i>Lactococcus lactis</i> isolée après coloration de Gram .....	58
<b>Figure 19</b> : Antibiogramme des souches de <i>S. aureus</i> .....	64
<b>Figure 20</b> : Zones d'inhibition du test des spots .....	69
<b>Figure 21</b> : Diamètres des zones d'inhibition des souches de <i>Lc. lactis</i> à l'égard des souches de <i>S. aureus</i> isolées de mammites .....	71
<b>Figure 22</b> : Test des puits .....	74
<b>Figure 23</b> : Evolution du pH du laitensemencé avec les souches de <i>Lc. lactis</i> (En fonction du temps).....	76
<b>Figure 24</b> : Evolution de l'acidité Dornic du laitensemencé avec les souches de <i>Lc. lactis</i> (En fonction du temps).....	77
<b>Figure 25</b> : Evolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en culture mixte avec <i>Lc. lactis</i> et en culture pure dans le lait écrémé.....	80
<b>Figure 26</b> : Fromage frais moulé en boîtes de Pétri .....	84
<b>Figure 27</b> : Evolution de la population de <i>S. aureus</i> dans les fromages, seule et en présence de <i>Lc. lactis</i> .....	85

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I</b> : Caractéristiques des espèces et sous espèces du genre <i>Lactococcus</i> .....	<b>5</b>
<b>Tableau II</b> : Différentiation de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> et subsp. <i>cremoris</i> .....	<b>7</b>
<b>Tableau III</b> : Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> .....	<b>23</b>
<b>Tableau IV</b> : Propriétés physique et chimique des entérotoxines staphylococciques.....	<b>25</b>
<b>Tableau V</b> : Classification des antibiotiques selon leur potentiel de distribution dans la mamelle après une administration parentérale ou intra-mammaire .....	<b>30</b>
<b>Tableau VI</b> : Identification des souches de lactocoques .....	<b>32</b>
<b>Tableau VII</b> : Origines des échantillons de lait .....	<b>36</b>
<b>Tableau VIII</b> : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches retenues .....	<b>53</b>
<b>Tableau IX</b> : Résultats des tests d'identification physiologiques des lactocoques .....	<b>56</b>
<b>Tableau X</b> : Résultats des tests d'identification biochimiques des lactocoques .....	<b>57</b>
<b>Tableau XI</b> : Résultats de l'identification des souches de <i>S. aureus</i> .....	<b>60</b>
<b>Tableau XII</b> : Résultats du dénombrement des souches de <i>S. aureus</i> .....	<b>62</b>
<b>Tableau XIII</b> : Résultats des antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i> isolées.....	<b>63</b>
<b>Tableau XIV</b> : Dénombrement des souches de <i>Lc. lactis</i> .....	<b>68</b>

## *Liste des tableaux en annexe*

### **Annexe I. Composition des milieux de culture**

**Tableau I** : Gélose Chapman

**Tableau II** : Gélose Mueller Hinton

**Tableau III** : Bouillon nutritif

**Tableau IV**: Bouillon M17 :

**Tableau V** : Milieu cœur-cerveau (BHI)

**Tableau VI**: Milieu PCA(Plate Count Agar).

**Tableau VII** : Eau physiologique

### **Annexe II. Données bibliographiques.**

**Tableau I** : Propriété d'identification et d'indentification de *Lc. lactis* (Teuber et Geis 2006)

**Tableau II** : Caractéristiques des Espèces de *Lctococcus* (Kimoto *et al.* 2004)

**Tableau III** : Profils fermentaires des lactocoques (Dellaglio *et al.*, 1994).

**Tableau IV** : Diamètres des zones d'inhibition édités par le CFA-SFM, 2006

### **Annexe III. Résultats**

**Tableau I** : Diamètres des zones d'inhibition des souches de *Lc. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* par le test des spots (en millimètre)

**Tableau II** : Cinétique de la croissance de *S. aureus*( Log du nombre de cellules/ml) en culture pure dans du lait écrémé : Inoculum de départ environ  $10^5$  cellules/ ml

**Tableau III** : Cinétique de la croissance de *S. aureus* (Log du nombre de cellules/ml) en culture mixte avec *Lc. lactis* : Inoculum de départ : *Lc. lactis* à  $10^8$  cellules/ ml, *S. aureus* à  $10^5$  cellules/ ml

**Tableau IV**: Cinétique de la croissance de *S. aureus* (Log du nombre de cellules/ml) en culture mixte avec *Lc. lactis* : Inoculum de départ : *Lc. lactis* à  $10^9$  cellules/ ml, *S. aureus* à  $10^5$  cellules/ ml

**Tableau V**: Acidité titrable des souches de *Lactococcus lactis*

**Tableau VI**: pH des souches de *Lactococcus lactis*

**Tableau VII**: Log des dénombrements dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul

**Tableau VIII** : Log des dénombrements dans les fromages inoculés avec *S. aureus* et *Lc. lactis*

#### **Annexe IV. Résultats des tests statistiques**

**Tableau I :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 1<sup>er</sup> jour de stockage

**Tableau II :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 2<sup>ème</sup> jour de stockage

**Tableau III :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 3<sup>ème</sup> jour de stockage

**Tableau IV :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 4<sup>ème</sup> jour de stockage

**Tableau V :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 5<sup>ème</sup> jour de stockage

**Tableau VI :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 6<sup>ème</sup> jour de stockage

**Tableau VII :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 7<sup>ème</sup> jour de stockage

**Tableau VIII :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 14<sup>ème</sup> jour de stockage

**Tableau IX:** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*. 21<sup>ème</sup> jour de stockage

# Sommaire

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

## Synthèse bibliographique

<b>I- Les lactocoques</b> .....	4
1- Caractères généraux .....	6
2- Habitat .....	8
3-Exigences nutritionnelles .....	8
4- Intérêt des lactocoques dans la fabrication fromagère .....	10
4-1- intérêt technologique des lactocoques .....	10
4-1-1- Coagulation du lait .....	10
4-1-2- Affinage .....	11
4-2- Antagonisme des lactocoques envers les bactéries pathogènes .....	12
4-2-1- Inhibition par la production de peroxyde d'hydrogène .....	12
4-2-2- Inhibition par production d'acides organiques .....	13
4-2-3- Inhibition par production de diacétyle.....	13
4-2-3- Inhibition par production de bactériocines .....	14
<b>II-<i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	21
1-Historique.....	21
2- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2-1- Caractéristiques générales .....	21
2-2- Pouvoir pathogène .....	22
3- Les entérotoxines staphylococciques .....	24
3-1- Mode d'action.....	26
3-2- Les toxi-infections alimentaires.....	27
4-Les mammites .....	29
4-1- Définition.....	29
4-2- Traitement.....	29

## Partie pratique

<b>*Matériel et méthodes</b> .....	31
<b>I-Isolement des lactocoques</b> .....	31
I-1-Provenance des échantillons de lait.....	31
I-2-Isolement .....	31
I-3-Purification .....	31
I-4-Identification .....	31
I-5-Séquençage de l'ARN 16S de la souche de lactocoque retenue .....	34
<b>II-Isolement et purification de souches de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	36
II-1-Isolement .....	36
II-2-Identification des souches .....	37
<b>III-Standardisation des <i>inocula</i> bactériens</b> .....	38
III-1-Préparation de l'inoculum standard des souches de lactocoque.....	38
III-2-Préparation de l'inoculum standard des souches de <i>S. aureus</i> .....	38

IV-Antibiogramme des souches de <i>S. aureus</i> .....	39
IV-1- Préparation de l'inoculum .....	39
IV-2- Ensemencement .....	42
IV-3- Lecture .....	42
V-Recherche de l'activité antibactérienne des lactocoques à l'égard de <i>S. aureus</i> .....	43
V-1-Test des Spots .....	43
V-2- Test de l'activité du surnageant de culture des souches de lactocoques..	45
V-2-1- Test des puis .....	45
V-2-2- Concentration du surnageant .....	45
V-2-3- Adsorption des substances antibactériennes sur la paroi de la souche productrice .....	45
VI-Cinétique d'acidification des souches de lactocoques .....	46
VI-1-Mesure du pH .....	46
VI-2-Détermination de l'acidité titrable .....	46
VII-Culture mixte dans du lait écrémé stérile de la souche de lactocoque retenue et <i>S. aureus</i> .....	47
VIII-Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> résistant aux antibiotiques dans un fromage frais inoculé avec la souche de lactocoque retenue .....	49
VIII-1-Fabrication du fromage frais .....	49

## Résultats et discussion

I-Isolement et identification des souches de Lactocoques .....	53
I-1- Isolement des souches de lactocoques .....	53
I-2- Identification des souches isolées .....	55
II- Isolement et identification des souches de <i>S. aureus</i> .....	59
II-1- Isolement .....	59
II-2- Identification des souches isolées .....	59
II-3 Standardisation des <i>inocula</i> .....	62
III- Antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i> identifiées.....	63
IV- Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches de <i>Lc. lactis</i> isolées à l'égard des souches de <i>S. aureus</i> résistantes aux antibiotiques .....	68
IV-1- Standardisation des <i>inocula</i> .....	68
IV-2- Test des spots.....	68
IV-3- Recherche de l'activité antibactérienne du surnageant de culture de <i>Lc.</i> <i>lactis</i> .....	74
V- Activité acidifiantes des souches de <i>Lc. lactis</i> .....	75
V-1- Evolution du pH.....	76
V-2- Evolution de l'acidité titrable .....	77
VI- Culture mixte dans du lait écrémé stérile de <i>Lc. lactis</i> Lc1 et de <i>S. aureus</i> résistant aux antibiotiques .....	79
VII- Le fromage frais.....	84
VII-1- Mise en évidence de l'activité antibactérienne de <i>Lc. lactis</i> à l'égard de <i>S. aureus</i> résistant aux antibiotiques dans le fromage .....	84
<b>Conclusion</b> .....	89
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

# *INTRODUCTION*

## **Introduction**

En Algérie 18% des cas d'intoxications alimentaires recensés sont dus à la consommation de produits laitiers (Anonyme). L'espèce bactérienne la plus fréquemment incriminée dans les toxi-infections impliquant le lait cru et les produits laitiers demeure *Staphylococcus aureus* (De Buyser *et al.*, 2001; 2005) et l'une des principales causes de contamination du lait cru par *Staphylococcus aureus* reste la mammite sub-clinique. (Normano *et al.* 2007a).

La mammite est une maladie insidieuse qui affecte lourdement le cheptel laitier causant ainsi de grandes pertes au secteur agroalimentaire (Melchior *et al.*, 2005). *S. aureus* est l'agent étiologique des mammites clinique et sub-clinique le plus prépondérant et le plus contagieux (Peles *et al.*, 2007). Le traitement et la prévention de cette infection requièrent l'utilisation massive d'antibiotiques, ce qui est en partie responsable de l'émergence de souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline chez les troupeaux laitiers (Lollai *et al.*, 2008)

Les premières résistances aux antibiotiques sont apparues quelques années après l'utilisation de la pénicilline qui fut dans les années quarante, l'antibiotique de choix pour traiter les infections à *S. aureus*. De nouvelles molécules furent alors commercialisées, et deux ans après l'introduction de la méthicilline en 1959 comme un anti-staphylococcique puissant, les premières souches résistantes à cette molécule ont été rapportées en Angleterre (Chambers *et al.*, 1988; Sevin *et al.*, 1999), et actuellement les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) ont une distribution mondiale (Soussy, 2007).

Depuis le premier constat de souches SARM responsables de mammites du cheptel laitier par Devriese *et al.* (1972), de nombreux cas de mammites à SARM chez les troupeaux laitiers ont été rapportés (Kwon *et al.*, 2005; Kaszanyitzhy-Juhasz, 2007; Moon *et al.*, 2007), la présence de telles souches chez le troupeau laitier est considéré comme étant une zoonose transversale par la directive européenne (99 /2003/EC) (EU 2003) et constitue donc une menace directe pour l'Homme.

Kaszanyitzhy-Juhasz, (2007) ont rapporté le premier cas de transmission directe de souches SARM entre les vaches et l'Homme, ce qui a matérialisé cette menace.

Le passage des souches de *S. aureus* vers le lait est très fréquent, Normano *et al.* (2005) ont rapporté que sur 437 échantillons de lait cru testés 38,4% contenaient *S. aureus*. Ce constat est alarmant d'autant plus, lorsque ces souches sont résistantes aux antibiotiques (Kwon *et al.*, 2005). Les industries laitières sont particulièrement préoccupées par ce problème, notamment celles qui produisent du fromage au lait cru. Pour remédier à cela, les techniques actuelles préconisent la pasteurisation ou alors l'utilisation de souches starters actives ou encore l'emploi de souches protectrices douées d'activité antibactérienne à l'égard des germes pathogènes et d'altération (Hamama *et al.*, 2002)

Les starters pour fromage sont en grande majorité constitués de *Lactococcus lactis* (Herrerros *et al.*, 2007), cette bactérie lactique généralement reconnue sans danger, dite aussi "possédant le statut de GRAS" (Generally Recognized As Safe) est de plus en plus sollicitée et étudiée pour lutter contre les microorganismes indésirables. De nombreuses études ont recherché l'effet inhibiteur des lactocoques à l'égard de *Staphylococcus aureus*. Cependant peu d'études semblent s'être intéressées à l'interaction entre les lactocoques et *S. aureus* résistant aux antibiotiques (Nunez et Medina, 1980, Hamama *et al.*, 2002; Charlier *et al.*, 2008a).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour objectif de mettre en évidence le pouvoir antagoniste de souches de *Lactococcus lactis* à l'égard de souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline.

Un isolement et une identification de souches de *S. aureus* à partir de différents laits mammiteux avant, pendant et après le traitement aux antibiotiques seront menés. Des antibiogrammes de souches identifiées comme étant *S. aureus* seront effectués afin de rechercher une éventuelle résistance aux antibiotiques.

Par ailleurs, des souches de lactocoques seront isolées et identifiées à partir de différents échantillons de lait cru. Ensuite les souches de lactocoques isolées et identifiées seront criblées pour leur effet antibactérien à l'égard des souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques

Enfin, une étude de l'interaction des deux souches retenues après criblage de lactocoques et *S. aureus* multi-résistant sera réalisée dans du lait écrémé et dans un

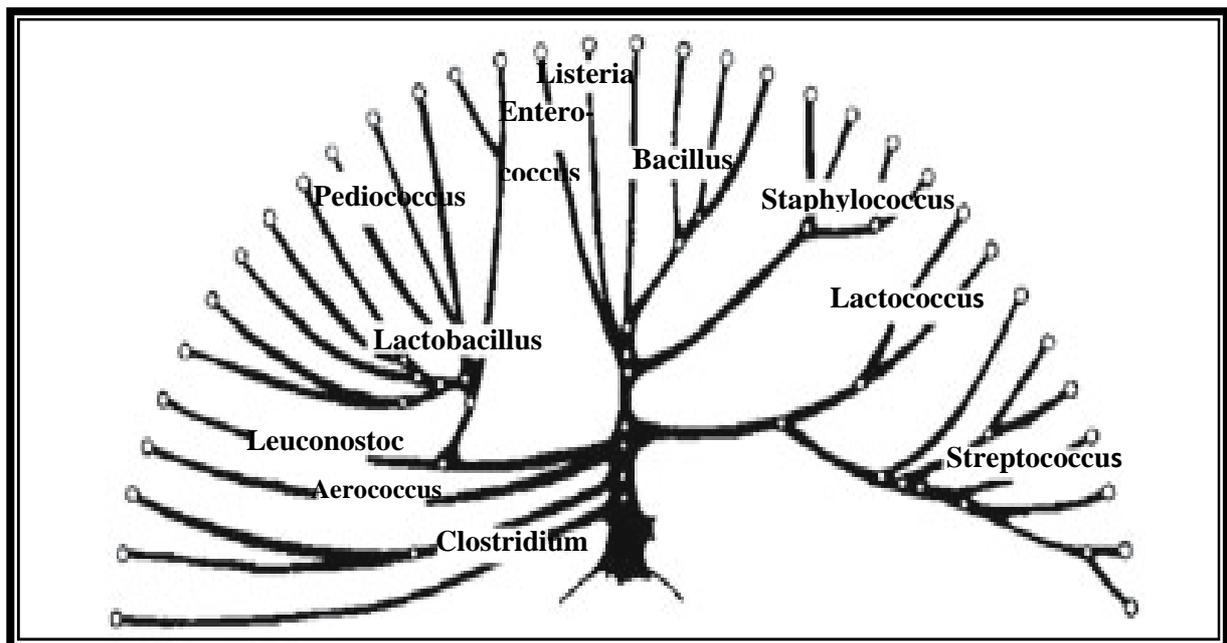
fromage frais au lait cru, mis au point au laboratoire et inoculé avec ces deux souches, afin de suivre l'évolution de la croissance de *S. aureus* dans le fromage lors du stockage à 4°C. Les résultats attendus permettraient d'entrevoir la possibilité de réaliser des fromages au lait cru exempts de *Staphylococcus aureus*.

*SYNTHESE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

*Les lactocoques*

En 1873, dix ans après que Pasteur eut étudié la fermentation lactique, la première culture pure de bactéries lactiques a été obtenue par Lister, il lui donna l'appellation de “*Bacterium lactis*”, celle-ci fut renommée plus tard par Orla-Jensen (1919) en “*Streptococcus lactis*”. Sur la base de ré-investigations exhaustives, Schleilfer et ses collaborateurs (1985) ont proposé la séparation des streptocoques du groupe N (selon la classification de Lancefield, 1933) des streptocoques oraux, entérocoques et Streptocoques hémolytiques, et ont suggéré le nouveau genre «*Lactococcus* » (Teuber et Geis, 2006), Actuellement ce genre fait parti du fillum des Firmicutes, la classe des Bacilli et la famille des Streptococaceae.( Bergey’s manual, 2007)

La position des lactocoques dans l’arbre de l’évolution phylogénique des bactéries à Gram positif illustrée dans la figure 1 montre leur incontestable séparation des genres pathogènes de Streptocoques.



**Figure1** : Arbre d’évolution phylogénique des bactéries Gram positif montrant la position de *Lactococcus*. Les données sont basées sur les similitudes des séquences d’oligonucléotides de l’ARNr 16S (Teuber et Geis, 2006).

La taxonomie moléculaire des lactocoques a abouti à la différenciation de cinq espèces : *Lc. lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. plantarum* et *Lc. piscium*. *Lc.*

*lactis* englobe trois sous espèces et un biovar, *Lc. lactis subsp lactis*, *Lc. lactis subsp cremoris*, *Lc. lactis subsp horniae*, *Lc. lactis biovar diacetyllactis* (Mofredj *et al.*, 2007 ; Casalta et Montel, 2008). Le tableau I illustre quelques caractéristiques des espèces du genre *Lactococcus*.

**Tableau I :** Caractéristiques des espèces et sous espèces du genre *Lactococcus*

	Source possibles (Dellaglio <i>et al.</i> , 1994)	Type de peptidoglycane s (Larpen, 1996)	Ménnaquinone s (Teuber et Geis, 2006)
<i>Lc. lactis subsp. lactis</i>	Lait cru et produits laitiers	Lys-D-Asp	MK-9,MK-8
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i>	Lait cru et produits laitiers	Lys-D-Asp	MK-9,MK-8
<i>Lc. lactis subsp. horniae</i>	Feuilles de houblon.	Lys-D-Asp	MK-8,MK-9
<i>Lc. garviae</i>	Mammites des bovins et Truites Arc-en-ciel malades.	Lys-Ala-Gly- Ala	MK-9,MK-8
<i>Lc. plantarum</i>	Petits pois congelés	Lys-Ser-Ala	-
<i>Lc. raffinolactis</i>	Lait cru, carottes, intestins des termites	Lys-Thr-Ala	-
<i>Lc. piscium</i>	Maladie des poissons et bœuf surgelé.	-	-

Asp : asparagine, Lys : lysine, Ala : alanine, gly : Glycine, Thr: threonine,

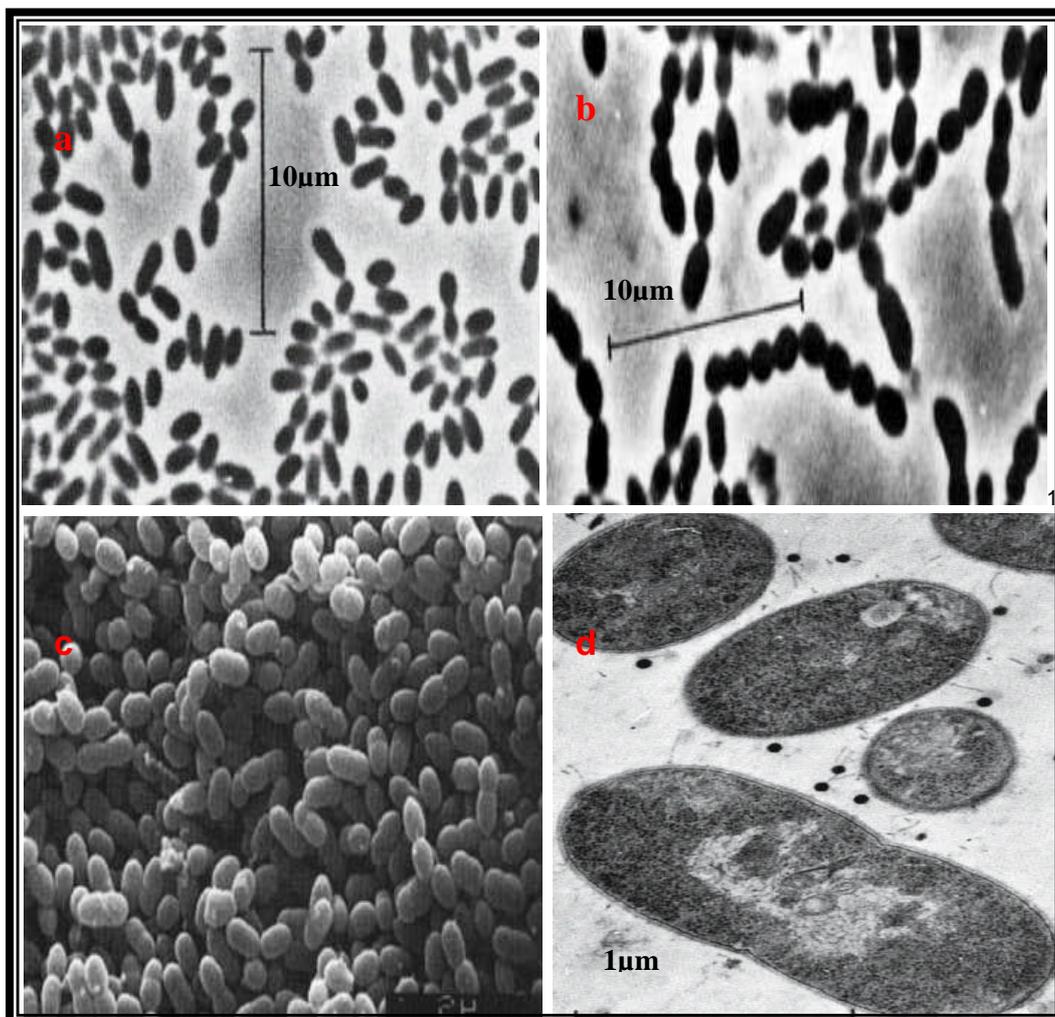
MK8: menaquinones avec 8 unités isoprènes, MK9: menaquinones avec 9 unités isoprènes

ND : non déterminé.

*Lc. lactis* est l'espèce type du genre, les deux sous espèces *Lc. lactis subsp. lactis* et *Lc. lactis subsp. cremoris* sont d'une grande importance économique de par leur utilisation en industrie laitière.

### 1. Caractères généraux :

*Lactococcus lactis* est une bactérie à Gram positif, dont les cellules de 0,5–1 µm de diamètre en forme de coques ovoïdes sont associées en paires ou en chainettes de longueur variable (Figure 2). Sa température optimale de croissance est voisine de 30°C, possédant la capacité de croître à des températures de 10°C à 40°C, est aéro-anaérobie facultatif, doté d'un métabolisme fermentaire produisant exclusivement de l'acide lactique sous sa forme L+.



**Figure 2 :** Observation au microscope électronique à contraste de phase de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, a : formant des paires de cellules ovoïdes, b : formant des chaînettes de longueurs variables ; c : micrographie électronique de *Lc. lactis biovar diacetylactis* ; d : micrographie électronique d'une fine section de *Lc. lactis ssp. lactis* après infection bactériophagique (Teuber et Geis, 2006).

Habituellement *Lc. lactis ssp. lactis* croit à 4% de NaCl mais pas à 6,5% ni à pH 9,6, son pH optimum se situe entre 6,3 à 6,5 (Dacosta, 2000; De Roissard, 1994; Andersen *et al.*, 2008). Les deux sous espèces *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* possèdent des propriétés de résistance au stress différentes, Kim *et al.* (1999) et Sanders *et al.* (1999) ont montré que la sous espèce *Lc. lactis* subsp. *lactis* était généralement plus "robuste" que *Lc. lactis* subsp. *cremoris* en ce qui concerne sa résistance à l'acidité, à la bile, au sel et à la congélation. Le tableau II, illustre quelques caractères de différenciation entre les deux sous espèces.

**Tableau II :** Différenciation de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Hassan et Frank, 2001)

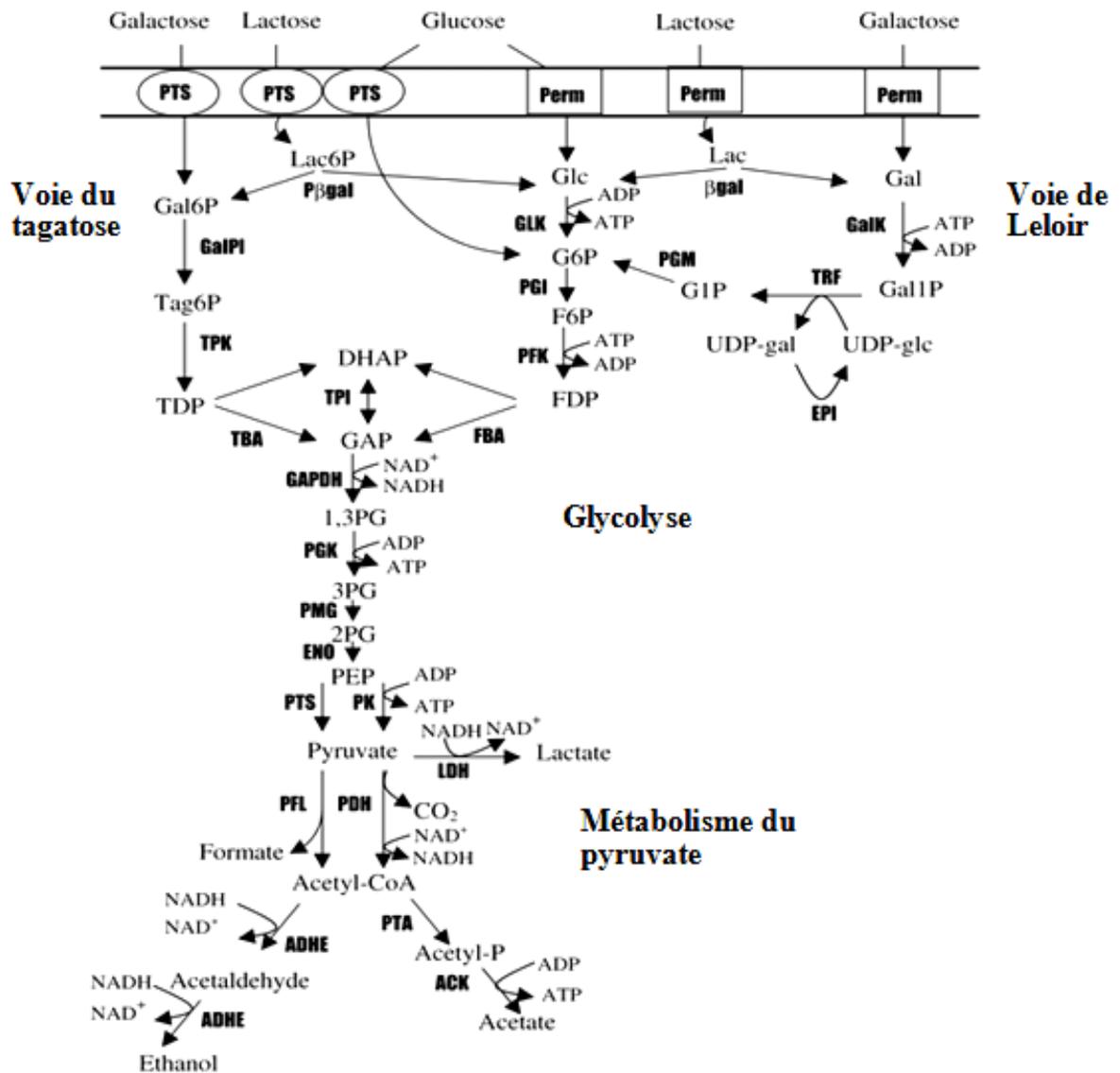
Caractéristiques	<i>Lactococcus lactis ssp.</i>	
	<i>lactis</i>	<i>cremoris</i>
<b>Croissance à 40°C</b>	+	-
<b>Hydrolyse de l'arginine</b>	+	-
<b>Croissance à 4% de NaCl</b>	+	-
<b>Production d'acide à partir</b>		
<b>Lactose</b>	+	+
<b>Galactose</b>	+	+
<b>Maltose</b>	+	-
<b>Ribose</b>	+	-

## **2. Habitat**

L'habitat naturel de *Lc. lactis* est généralement les plantes et la peau des animaux, il est admis que la présence des lactocoques dans le lait cru revient à une contamination pendant la traite par les fourrages. Cependant l'habitat le plus fréquent de *Lc. lactis* demeure le lait, les laits fermentés et les fromages (Tableau 1) (Casalta et Montel, 2008).

## **3. Exigences nutritionnelles et métabolisme**

*Lactococcus lactis* est un micro-organisme très exigeant, doté d'une capacité de biosynthèse très limitée, il requiert donc pour sa croissance un apport extérieur de sucres fermentescibles, différentes vitamines, acides aminés, phosphate, potassium et magnésium (Oleivera et al., 2005). La figure 3 représente les différentes voies métaboliques utilisées par *Lc. lactis* pour l'utilisation du lactose, glucose et galactose. La plupart des sucres pénètrent dans le cytoplasme grâce au système de transport phosphoenol-pyruvate- phosphotransferase (PEP-PTS) ou bien via des perméases. Les souches de *Lc. Lactis* suivent principalement une voie homofermentaire où 90 à 95% des sucres consommés sont convertis en acide lactique. Cependant sous certaines conditions et pour certaines souches de *Lc. lactis*, la voie homolactique subit une déviation vers la voie hétérolactique, ce qui mène donc à la formation d'autres produits que l'acide lactique : éthanol, acétate, formate (Neves et al 2005 ; Pedersen et al., 2005).



Glc : Glucose ; G6P : glucose-6-phosphate ; G1p : Glucose-1-phosphate ; F6P : Fructose-1-phosphate ; FDP : Fructose-1,6,- diphosphate ; DHAP : dihydroxyacétone-phosphate ; GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate ; 1,3PG : 1,3diphosphoglycerate ; 3PG : 3-phosphogycérate ; 2PG : 2-phosphoglycerate ; PEP : phosphoénolpyruvate ; Tag6P : tagatose-6-phosphate ; TDP : tagatose-1,6-diphosphate ; Gal : galactose ; Gal6P : Galactose-6-phosphate ; Gal1P : galactose-1-phosphate ; GLK : glucokinase ; PGI : glucose phosphate isomerase ; PFK : phosphofructokinase ; FBA : Fructose-biphosphate aldolase ; TPI : triose phosphate isomerase ; GAPDH : glyceraldehyde-phosphate déshydrogenase ; PGK : phosphoglycérate kinase ; PMG : phosphoglycérate mutase ; ENO : énolese ; PK : pyruvate kinase ; GalPI : galactose-phosphate isomérase ; TPK : tagatose-phosphate kinase ; TBA : tagatose biphosphate aldolase ; GalK : galactokinase ; TRF : galactose/uridyl transférase ; EPI : UDP-glucose isomérase ; PMG : phosphoglucomutase ; LDH : lactate deshydrogenase ; ADHE : alcool déshydrogénase.

**Figure 3: Métabolisme du lactose, glucose et galactose chez *Lc. lactis* (Cocaign-Bousquet *et al.*, 2002)**

#### **4. Intérêt des lactocoques dans la fabrication des fromages :**

*Lactococcus lactis* est largement utilisé dans la fabrication fromagère. Il intervient dans la formation du caillé et le développement des qualités organoleptiques des produits finis, il participe également à l'inhibition des flores pathogènes telles que *S. aureus* (Charlier *et al.*, 2008a).

##### **4.1. Intérêt technologique des lactocoques :**

Les ferments lactiques utilisés en industrie fromagère sont composés en grande majorité de lactocoques (Ayad, 2009). Cette flore joue trois grands rôles, elle est tout d'abord responsable de l'acidification du lait à la suite de l'hydrolyse du lactose (Flambard *et al.*, 1997); elle est également à l'origine de la formation de saveur, due principalement à son activité protéolytique, qui consiste en la dégradation enzymatique des protéines du lait, ce qui mène à la formation de composés sapides (peptides amers) ou de précurseurs d'arôme (acides aminés). La présence d'endopeptidases permet d'éliminer les peptides amers formés et d'augmenter la concentration d'acides aminés libres. Enfin, elle permet de limiter le développement de germes indésirables, grâce à la production d'acides et d'éventuelles substances inhibitrices telles les bactériocines.. Pour pouvoir jouer ces différents rôles, *Lc. lactis* doit atteindre un niveau de population assez important (Thivierge, 1999; Hassan et Frank, 2001).

##### **4.1.1. Coagulation du lait :**

La coagulation représente la première étape de transformation du lait qui constitue la principale matière première des fromages. Le lait est un milieu complexe contenant de nombreux composés essentiels pour la constitution des fromages, tels que les matières grasses, le lactose, les matières protéiques et les matières minérales ainsi que des micro-organismes (Agioux, 2003).

La coagulation consiste à séparer le caillé (concentré) du lactosérum (très riche en eau), elle correspond à la précipitation des protéines rendues insolubles par l'abaissement du pH dû à l'acide lactique (Lucey, 2002). Pour certains fromages, l'action des bactéries est complétée par celle des enzymes de la présure (Desmazeaud, 1998).

Pendant la fermentation, le pH du lait diminue et les propriétés physico-chimiques des micelles de caséines sont profondément modifiées. Les fonctions acides de certains acides aminés, comme les acides glutamique et aspartique et la phosphosérine, fixent les protons formés, entraînant une annulation progressive de la charge négative des micelles. Celles-ci se rapprochent et établissent entre elles des liaisons hydrophobes et électrostatiques, ce qui conduit à la formation du gel lactique (Béal et Sodini, 2003).

#### **4.1.2. Affinage :**

De manière générale, l'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé. Ce substrat, issu de la coagulation et de l'égouttage du lait, est constitué de matière protéique, de matière grasse et d'une fraction des composants solubles du lait. Au cours de l'affinage, le caillé est transformé sous l'action d'enzymes produites par les souches de *Lactococcus* introduites (E1 Soda, 1993).

Les lactocoques sont dotés d'un système protéolytique complexe (Mahaut *et al.*, 2005). Durant la phase d'affinage : le fractionnement des caséines modifie la texture de la pâte, certains des peptides et des acides aminés libérés sont des précurseurs de substances aromatiques (Desmazeaud, 1998), comme le diacétyle produit par *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Canteri, 1997). Sachant que le diacétyle dégage un arôme intense de beurre à partir d'une concentration de 1 à 4 ppm (Dacosta, 2000).

Bien que la lipolyse soit faible, les composants qui en résultent, ont une grande influence sur le goût et l'arôme. Une partie des acides gras donnent par estérification des composés tels que le butyrate d'éthyle, hexenoate d'éthyle et méthylcétone, qui contribuent à la formation de saveur. Les lactocoques mésophiles sont en général plus lipolytiques que les bactéries de yaourt (Lucas et Reyrolles 1989; Olson, 1990 ; Smit *et al.*, 2005)

## 4.2. Antagonisme des lactocoques envers les bactéries pathogènes

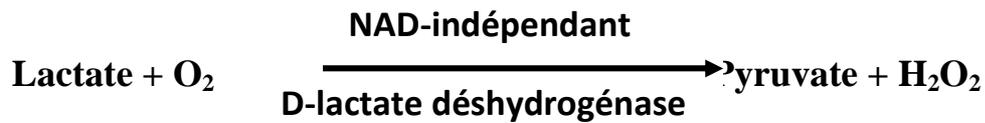
### 4.2.1. Inhibition par production de peroxyde d'hydrogène ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène est produit par *Lc. Lactis* en présence d'une flavoprotéine oxydase ou d'une NADH peroxydase. Celui-ci ne possède pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des groupes sulfhydriles des protéines, causant la dénaturation de nombreuses enzymes et la peroxydation des lipases membranaires. (Zalan *et al.*, 2005).

En plus de son effet bactéricide direct, le peroxyde d'hydrogène active le système lactoperoxydase-thiocyanate présent dans le lait, et génère l'hypothiocyanate (OSCN<sup>-</sup>), les radicaux O<sub>2</sub>SCN<sup>-</sup> et O<sub>3</sub>SCN<sup>-</sup>, ces produits d'oxydation intermédiaires ont un large spectre d'activité incluant les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Klaenhammer *et al.*, 1994; Yang, 2000; Dacosta, 2000).

L'action du peroxyde d'hydrogène peut également s'exercer à l'égard des germes à catalase positive. Ito *et al.* (2003) ont prouvé qu'une quantité de 350 ppm de peroxyde d'hydrogène produite par des souches de *Lc. Lactis* avait une action antimicrobienne efficace à l'égard de *Staphylococcus aureus*. Les principaux mécanismes de génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les bactéries lactiques sont représentés sur la figure4.





**Figure 4 :** Principaux mécanismes de génération du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les bactéries lactiques (Daeschel, 1989).

#### 4.2.2. Inhibition par production d'acides organiques

Les acides organiques produits par *Lc. Lactis* diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient, en inhibant une partie de la flore qui s'y développe, leur compétitivité est donc améliorée, étant donné leur grande tolérance aux bas pH intra et extracellulaires (Klaenhammer, 1993). Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte d'une action inhibitrice spécifique (Teuber et Geis., 2006). L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme en se dissociant et en augmentant la concentration interne en proton, cet afflux de protons réduit la force proton motrice, perturbant les échanges entre la cellule et son environnement (Ammor *et al.*, 2006).

La principale activité antimicrobienne exercée par les lactocoques résulte de la production, en quantités importantes, d'acide lactique (Nascimento *et al.*, 2008). Selon Baird Parker (1980), les concentrations en acide lactique non dissocié nécessaires pour obtenir une inhibition en milieu de culture sont supérieures à 0,01% pour les levures, les *Enterobacteriaceae*, les *Micrococcaceae*, supérieures à 0,02% pour les moisissures et supérieures à 0,03% pour les *Bacillaceae*. (Mathot *et al.*, 1996).

#### 4.2.3. Inhibition par production de diacétyle :

Le diacétyle, produit par de nombreuses bactéries lactiques, est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes. (Jay, 1982). Le diacétyle (2,3-butanedione) est métabolisé à partir du citrate ou du pyruvate par *Lactococcus lactis* particulièrement le

biovar *diacetylactis* (Hassan and Frank, 2001). Cependant, les concentrations nécessaires pour obtenir une inhibition sont très supérieures à celles présentes dans le beurre (100 ppm pour les bactéries les plus sensibles) et excèdent de très loin les doses susceptibles de provoquer l'apparition de l'arôme de beurre (2 à 7 ppm environ) (Larpent, 1996 ; Caplice *et al.*, 1999).

Selon Jay (1982), à la concentration de 200µg/ml, il inhibe les bactéries Gram négatif et les levures. Pour inhiber les bactéries Gram positif non lactiques et les bactéries lactiques, il faut respectivement atteindre 300 et 350µg/ml. (Dacosta, 2000).

#### **4.2.4. Inhibition par production de bactériocines**

La définition des bactériocines a considérablement changé depuis celle de Tagg *et al.* (1976), on considère actuellement qu'une bactériocine est toute molécule de nature protéique (fût-ce partiellement) synthétisée par voie ribosomique et libérée à l'extérieur de la cellule en état ou après modification, douée d'une activité bactéricide ou bactériostatique. (Canatiempo *et al.*, 1996; Hassan et Frank, 2001)

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont été classées par Klaenhammer (1993) en quatre classes sur la base de leur poids moléculaire, thermostabilité, sensibilité enzymatique, présence d'acides aminés post-traductionnellement modifiés et mode d'actions (Oscariz et Pisabarro, 2001 ; Heng *et al.*, 2007). Cependant aucune bactériocine de *Lc. lactis* n'appartient aux classe III et IV (Teuber et Geis, 2006). Les souches de *Lc. lactis* sont capables de synthétiser plus de trois bactériocines différentes.

Les bactéries productrices de bactériocines possèdent un système les immunisant contre leur propre bactériocine, chaque bactériocine possède son propre facteur d'immunité, la fonction exacte de ces facteurs n'est pas encore clairement élucidée. (Teuber et Geis, 2006).

##### **4.2.4.1. Bactériocine de Classe I : Lantibiotique**

Le terme lantibiotique fait référence à des peptides antibactériens ayant subi des modifications post-traductionnelles menant à la production d'acides aminés inhabituels

Lantionine et 3-méthyllantionine ainsi que dehydroalanine et dehydrobutirine. (Klaenhammer, 1993; Vessoni Penna *et al.*, 2006; Drosinos *et al.*, 2008)

#### **4.2.4.1.1. Lantibiotiques de type A (groupe Ia).**

Caractérisées par une structure allongée et flexible de nature amphiphile, leur PM varie entre 2 et 5 kDa, avec une charge positive nette (Bauer et Dicks, 2005) ce groupe renferme des peptides fibrillaires, agissant généralement en formant des pores dans les membranes cytoplasmiques des espèces cibles sensibles (Garneau *et al.*, 2002). La bactériocine type de ce groupe est la nisine celle-ci agit non seulement par la formation de pores, mais peut également empêcher la biosynthèse de la paroi cellulaire par sa fixation au lipide II et qui précède en fait probablement la formation de pores (Jack *et al.*, 1995; Heng *et al.*, 2007).

#### **4.2.4.1.2. Lantibiotiques de type B (groupe Ib)**

Caractérisés par une structure globulaire rigide et compacte, avec un PM < 2 kDa, ils contiennent approximativement 20 acides aminés, non chargés ou bien chargés négativement (Bauer et Dicks, 2005 ; Cleveland *et al.*, 2001 ). Ce type de lantibiotiques agit en inhibant le fonctionnement de certaines enzymes (Hécharde et Sahl, 2002). Il comprend la cinnamycine et la mersacidine, cette dernière tient son appellation de son action sur les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthycilline, elle agit comme la nisine en empêchant la biosynthèse du peptidoglycane (Dufour *et al.*, 2007)

#### **4.2.4.1.3. Autre Lantibiotiques : Lantibiotiques à deux composants**

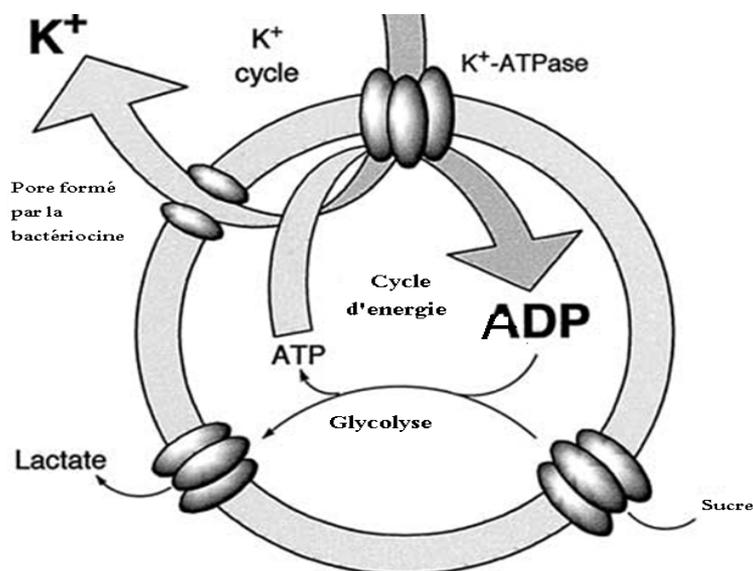
Ces lantibiotiques ont besoin de deux peptides qui agissent en synergie pour avoir une activité (Morisset *et al.*, 2005). Ces lantibiotiques sont aussi produits comme des prépeptides qui seront ensuite modifiés comme les lantibiotiques simples afin d'avoir tous les deux des acides aminés modifiés. La lacticine 3147, un lantibiotique à deux composants produit par des souches de *Lc. lactis*, agit également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (McAuliffe *et al.*, 2001). Elle a un spectre d'action large. Un des deux peptides, la lacticine A1, a une activité qui est plus élevée

en présence du deuxième peptide, la lacticine A2. Il a été récemment proposé que la lacticine A1 agirait en se liant au lipide II, inhibant la synthèse des peptidoglycanes et permettant à la lacticine A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible (Morgan *et al.*, 2005; Breukink, 2006; Wiedemann *et al.*, 2006).

- **Mode d'action des bactériocines de la classe I (Lantibiotiques) :**

Selon certains auteurs (Ruhr et Sahl, 1985; Tahara *et al.*, 1996; Herranz *et al.*, 2001), l'action des bactériocines se manifeste par la formation de pores dans la membrane plasmique des cellule cibles et la fuite des constituants cellulaires (ATP, K<sup>+</sup>) qui ont un rôle dans le maintien et l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte de l'intégrité induit la baisse de synthèse des macromolécules (ADN, ARN, protéines).

La figure 5 illustre un modèle de destruction cellulaire par les bactériocines par la formation de pores.



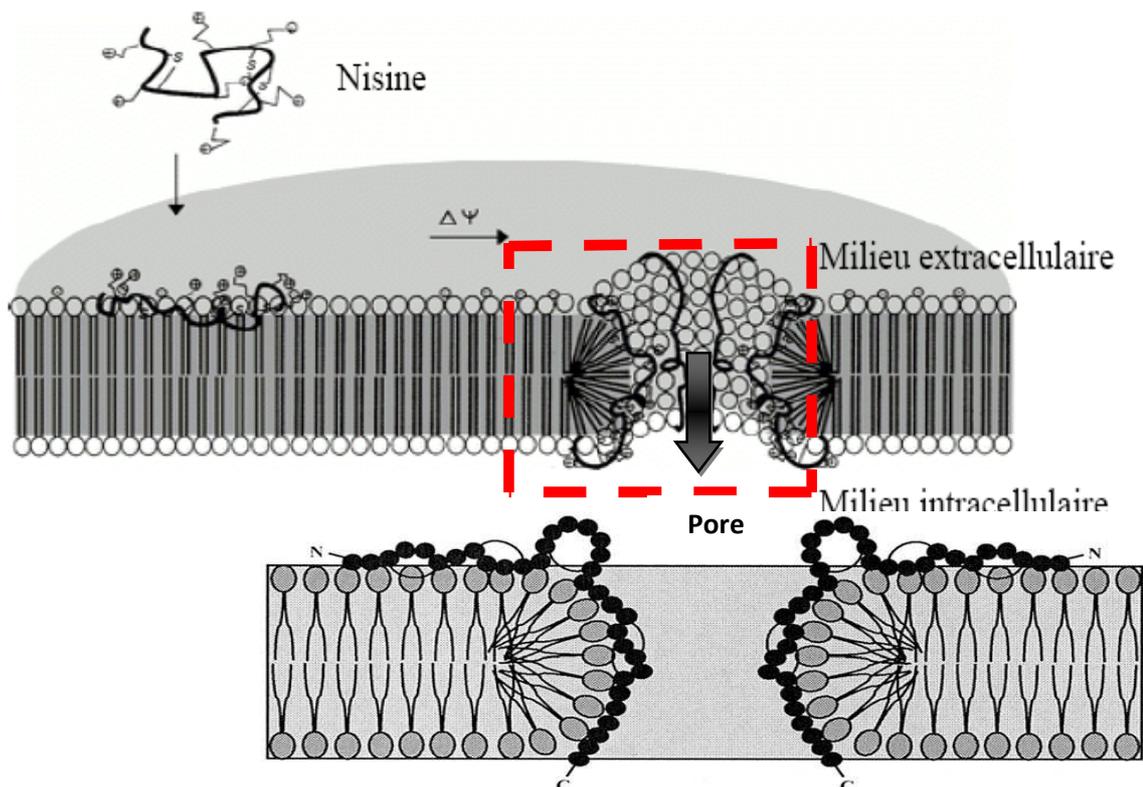
**Figure 5 :** Destruction cellulaire par formation de pores par des lantibiotiques.

(Garneau *et al.*, 2002 ).

Les lantibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des lantibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes. Néanmoins, certains forment également des pores dans la membrane des cellules

cibles (Bauer *et* Dicks., 2005). La nisine qui est un lantibiotique de type A, interagit avec le lipide II au niveau du MurNAC tandis que la mersacidine, un lantibiotique de type B, interagit avec le GlcNAc du lipide II (Dufour *et al.*, 2007; Willey *et al.*, 2007).

La flexibilité des lantibiotiques de type A leur confère la propriété d’agir en cale. Selon un modèle « Wedge » (figure 6). Une concentration minimale, en  $\mu\text{M}$ , est nécessaire pour entrainer une perturbation localisée de la conformation de la bicouche phospholipidique. En effet, la partie cationique du peptide interagit avec les têtes des phospholipides hydrophiles, entrainant ainsi la formation des pores en cale ou la surface de la membrane est pliée en arrière sur elle-même. La nisine et l’epidermine adoptent ce modèle (Héchard et Sahl , 2002).

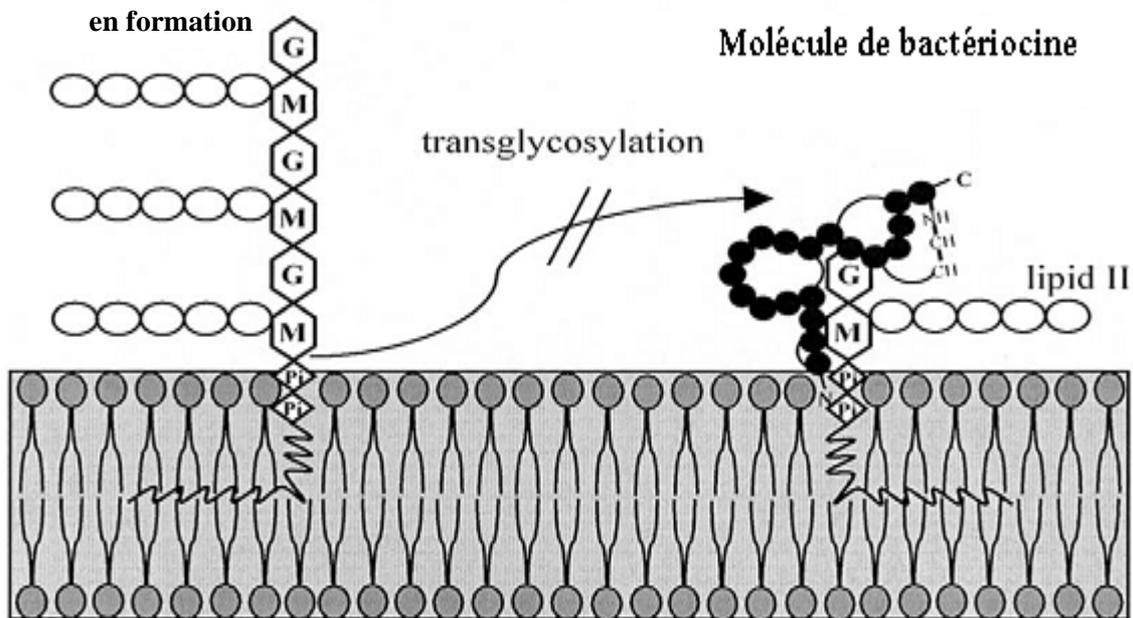


**Figure 6 :** Formation des pores selon modèle « Wedge » récepteurs-indépendant (Héchard et Sahl, 2002)

L’inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane s’opère au niveau de la transglycosylation, en formant un complexe avec le lipide II lié à la membrane qui représente le précurseur du peptidoglycane (Héchard et Sahl , 2002). Cette inhibition

provoque un arrêt de croissance. La lyse cellulaire dans ce cas est relativement ralentie par rapport au modèle de formation de pores.

**Chaîne de peptidoglycane**



**Figure 7 :** Inhibition de la biosynthèse de la paroi (Héchar d et Sahl , 2002)

**4.2.4.2. Bactériocines de classe II**

Cette classe comprend les peptides de taille inférieure à 10 KDa, thermostables et ne contenant pas d'acides aminés modifiés après traduction. Les bactériocines de cette classe sont dites « pediocin-like », possédant entre 35 et 50 acides aminés et sont de nature hydrophobe et / ou amphiphile (Ennahar *et al.*, 2000 ; Uteng *et al.* , 2002 ; Heng *et al.*, 2007).

**4.2.4.2.1. Sous-classe IIa**

Elle englobe les bactériocines formées d'un seul peptide non modifié, montrant une séquence consensus YGNGV(Xaa)C(Xaa)<sub>4</sub>V(Xaa)<sub>4</sub>A, (ou Xaa est un acide aminé non précis) à leur extrémité N- terminal et une séquence hydrophobe C-terminal hydrophobe très variable (Cenatiempo *et al.*, 1996 ; Oscaritz et Pisabaro, 2001) Les bactériocines de cette sous-classe font l'objet d'attention particulière des industries

agro-alimentaires notamment en raison de leur activité anti-*Listeria* (Cenatiempo *et al.*, 1996 ; Richard *et al.*, 2006).

#### **4.2.4.2.2. Sous-classe IIb**

Cette sous-classe regroupe les bactériocines à deux peptides dont l'action est synergique (Dacosta , 2000) . Séparément ces peptides ont peu ou pas d'activité et il ne semble y avoir aucune similitude de séquences entre les peptides complémentaires. La lactacine F et la lactococcine G sont des exemples de cette sous classe, ces complexes agissent en formant des pores (Ennahar *et al.*, 2000).

#### **4.2.4.2.3. Sous-classe IIc**

Cette sous classe inclue les bactériocines de classe II n'appartenant ni au groupe IIa, ni au groupe IIb et peut être subdivisé en deux sous groupes selon Oscariz et Pisabaro (2002).

- “Antibiotiques” avec un ou deux résidus cystéine (thiolbiotiques et cystibiotiques respectivement).
- “Antibiotiques” sans cystéine.

Exemple : Lactococcine A et Acidocine B.

### **Mode d'action des bactériocines de la classe II**

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe II est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur, la mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane et la mort de la cellule (Gravesen *et al.*, 2002; Vadyvaloo *et al.*, 2004). Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante, est l'assemblage de différentes molécules de la bactériocine, illustrée sur la figure 8. Les pores formés par les bactériocines de classe II causent la perte d'ions potassium ainsi que d'acides aminés et d'autres molécules de faible poids moléculaire, ce qui dissipe les deux composantes de la force proton-motrice (Bauer et Dicks *et al.*, 2005).

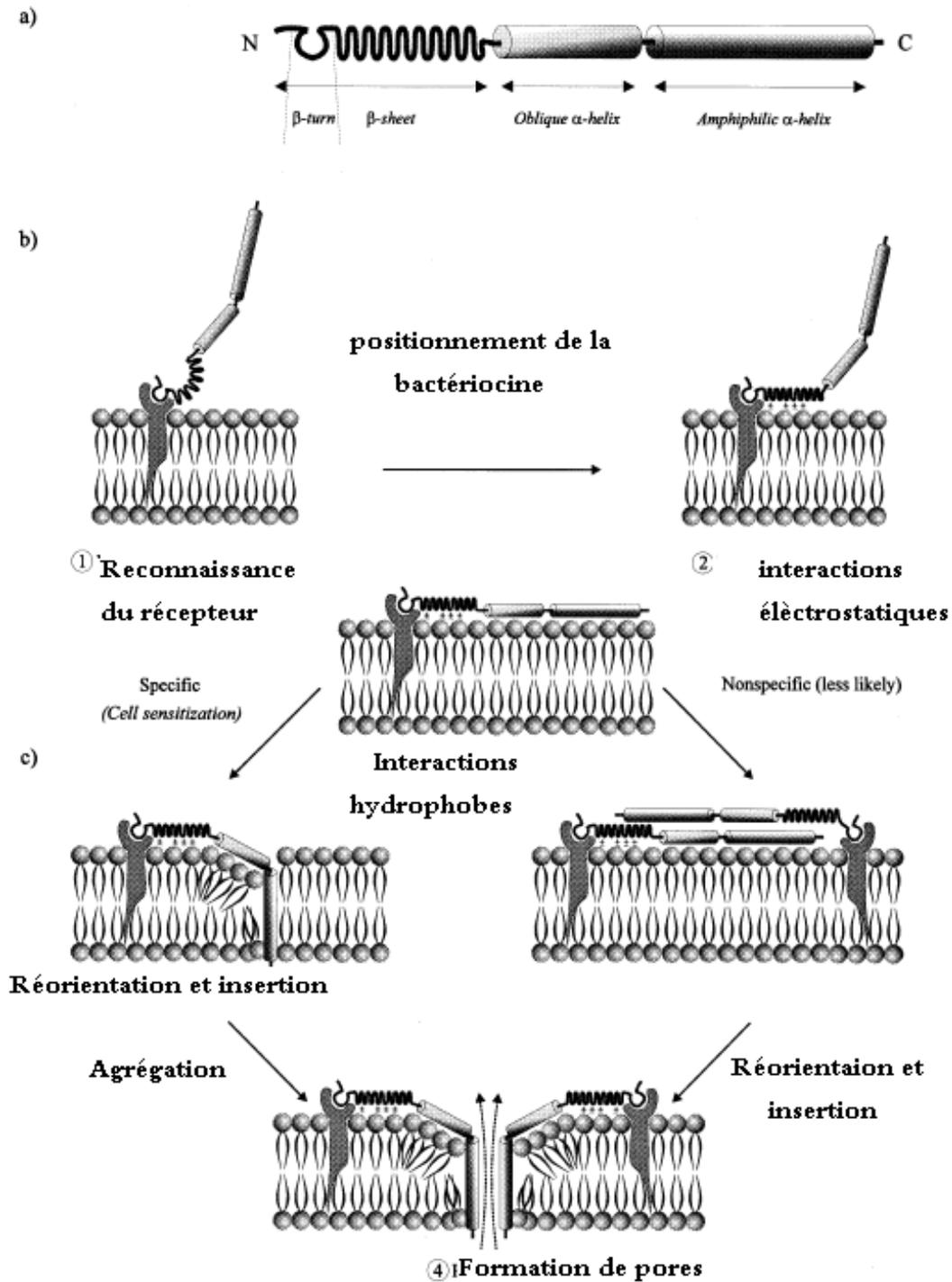


Figure 8 : Formation des pores par les bactériocines de la classe II (Ennahar *et al.*, 2000)

*Staphylococcus aureus*

## 1. Historique

Jusqu'en 1870, les staphylocoques étaient connus comme étant la cause des inflammations de la peau, ce n'est qu'en 1884 qu'ils ont été associés aux intoxications alimentaires, lorsque Vaughan et Sternberg ont isolé le germe d'un cheddar lié à 300 cas d'intoxications alimentaires dans le Michigan. En 1954, la relation entre les empoisonnements alimentaires à *Staphylococcus aureus* et la production de toxines a été établie par Baber (Elliot, 2001).

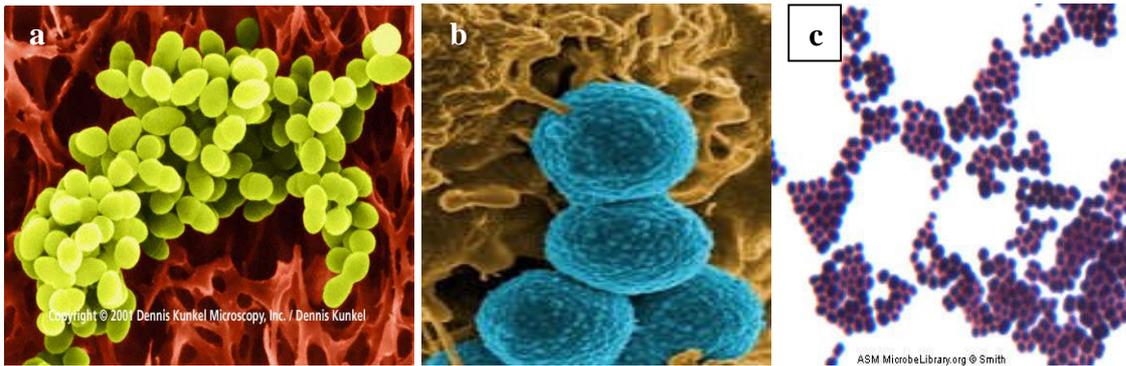
Le genre *Staphylococcus* appartient à la Classe des Bacilli, Ordre des Bacillales, famille des Staphylococcaceae (Bergeys manual, 2007).

Le genre *Staphylococcus* dispose de plus d'une trentaine d'espèces divisées en deux groupes selon leur aptitude à produire une coagulase. Actuellement sept espèces de ce genre sont à coagulase positive *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. Schleiferi subsp. coagulans*, *S. delphini*, *S. hycus*, *S. aureus subsp. aureus* et *S. aureus subsp. anerobius* (Sutra, 1998 ; Elliot, 2001; Taponen et Pyorala, 2008).

## 2. *Staphylococcus aureus*

### 2.1. Caractéristiques générales :

*Staphylococcus aureus* est une bactérie Gram positif de 1 µm de diamètre, donnant des colonies jaune-doré caractéristiques due à la production de pigments caroténoïdes. A l'examen microscopique elle apparaît sous forme de petites cocci en paires, petites chaînettes ou en amas donnant l'aspect de grappes (Figure 9), sa paroi cellulaire est formée de trois constituants majeurs: le peptidoglycane composé d'unités répétitives de N-acétylglucosamine β-1-4 liées à l'acide N-acétylmuramique, des acide téchoïques au ribitol liés via des N-acétylmanosaminyl β-1-4-N-acétylglucosamine au muramyl-6-phosphate, et la protéine A, liée au peptidoglycane par liaison covalente. (Sutra, 1998 ; Bhunia, 2008)



**Figure 9** : a, b : Micrographie électronique de *S. aureus*, c : coloration de Gram de *S. aureus*

*S. aureus* est aéro-anaérobie facultatif, présentant néanmoins une meilleure croissance en aérobiose, asporulée, immobile, catalase positive (excepté pour *S. aureus* subsp. *anaerobius*) et oxydase négative (Vernozy-Rozand, 1997; Guireau, 2003; Guireau et Rosec, 2004).

La majorité des souches de *S. aureus* isolées d'infections humaines produisent des polyosides capsulaires qui forment des microcapsules non visibles en microscopie optique (Sutra, 1998).

C'est un germe mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C (température minimale entre 5 et 10°C et maximale jusqu'à environ 45°C). Halotolérant, peut se multiplier en présence de concentration de NaCl allant jusqu'à 15%, et des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un optimum entre 7,0 et 7,5. (Sutra, 1998; Elliot, 2001).

Contrairement à la plupart des autres pathogènes alimentaires, *S. aureus* croît dans des conditions d'activité de l'eau assez faible  $A_w = 0,84$  et est capable de produire ses entérotoxines à une  $A_w = 0,86$  (Latter et Leistner, 1977; Vadamode *et al.*, 1981; Elliot, 2001).

## **2.2. Pouvoir pathogène :**

Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est dû à la production de différentes enzymes et toxines, représentées dans le tableau III, suivant :

**Tableau III** : Facteurs de virulence de *S. aureus* (Danman et Projan, 2001).

Facteur de virulence	Effet pathogène
Coagulase libre	Coagule le plasma et favorise donc l'isolement de l'infection dans un cocon protecteur.
Coagulase liée	-Favorise la fixation des bactéries sur les caillots ou sur les tissus recouverts de fibrinogène. -Elle intervient en protégeant les germes de l'action phagocytaire.
Hyaluronidase	Hydrolyse l'acide hyaluronique des tissus conjonctifs.
Phosphatase	Hydrolyse les différentes molécules phosphatées cellulaires.
Hémolysine $\alpha$	Responsable de la lyse des hématies.
Entérotoxines	Responsables des intoxications alimentaires par un mécanisme de super-antigène.
TSST1	Toxine de choc staphylococcique de même nature que les Entérotoxines pouvant provoquer un grave choc superantigénique.
Exfoliatine	Dissocie la couche granulaire de l'épithélium. Elle est responsable de lésions bulleuses. Le mécanisme d'action est superantigénique d'une part, et activateur probable d'une protéase clivant les desmosomes reliant les granuleuses de l'épithélium.
Protéine A	Provoque la fixation des IgG par le fragment Fc et isole donc les staphylocoques de l'action du site anticorps. Elle est cytotoxique, et déclenche la réaction inflammatoire.
Capsule et Slim factor	Ces polysaccharides protègent <i>S.aureus</i> contre la phagocytose et jouent un rôle dans la résistance aux antibiotiques en ralentissant l'entrée des antibiotiques à l'intérieur de la bactérie.

Leucocidine	Tue les granulocytes et les macrophages par fixation sur la membrane (souches provoquant des furoncles ou des pneumonies).
-------------	--

La production de ces différentes enzymes clés et plus particulièrement de la coagulase, la thermonucléase et la  $\beta$ -hémolysine permet de différencier *S. aureus* des autres espèces de *Staphylococcus*, ceux-ci associé à la sensibilité à la lysostaphine, ainsi que l'utilisation en anaérobiose du glucose et du mannitol. Dans le même sens, diverse recherches ont tenté d'associer ces différentes propriétés biochimiques à la production d'entérotoxines, ces tentatives ont généralement échoué (Jay *et al.*, 2005), par conséquent l'utilisation de la sérologie ou d'autres méthodes de détection des entérotoxines reste la seule preuve qu'une souche soit enterotoxinogène (Elliot, 2001).

### **3. Les entérotoxines Staphylococciques :**

Les entérotoxines staphylococciques (SE) sont de petites protéines de faible poids moléculaire (28000Da en moyenne) constituées d'une simple chaîne d'acides aminés repliée sur elle-même sous forme globulaire (Zang et Stewart, 2001; Le Loir *et al.*, 2003). Le tableau VI résume quelques propriétés physiques et chimiques des entérotoxines.

Les entérotoxines staphylococciques sont résistantes aux enzymes protéolytiques gastro-intestinales dont la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine, ce qui leur permet d'accéder au tractus intestinal, sans perte de leur activité, elles sont également assez thermostables, elles restent actives après ébullition pendant 30 minutes, cependant cette propriété dépend de plusieurs paramètres (type d'entérotoxines, le pH et sa concentration ainsi que la concentration de NaCl et l'activité de l'eau du milieu où elle se trouve). Des entérotoxines dénaturées par la chaleur peuvent être renaturées après une longue conservation ou en présence d'urée (Jay *et al.*, 2005; Antosia, 2006; Bhunia, 2008). Les entérotoxines sont exprimées de façons différentes et leur production dépend de la phase de croissance de la bactérie, SEA et SEJ sont généralement synthétisées pendant la phase exponentielle alors que SEB, SEC et SED

sont produites pendant la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance (Bhunia, 2008).

Les différentes entérotoxines staphylococciques, présentent des similitudes de conformation dans leur séquence d'acides amines (dont certaines très conservées), la chaîne polypeptidique des entérotoxines est constituée d'un large taux de lysine, acide aspartique, acide glutamique et de tyrosine. Elles possèdent toutes des activités biologiques similaires (Zang et Stewart, 2001) cependant sont sérologiquement distinctes (Elliot, 2001; Tran *et al.*, 2006).

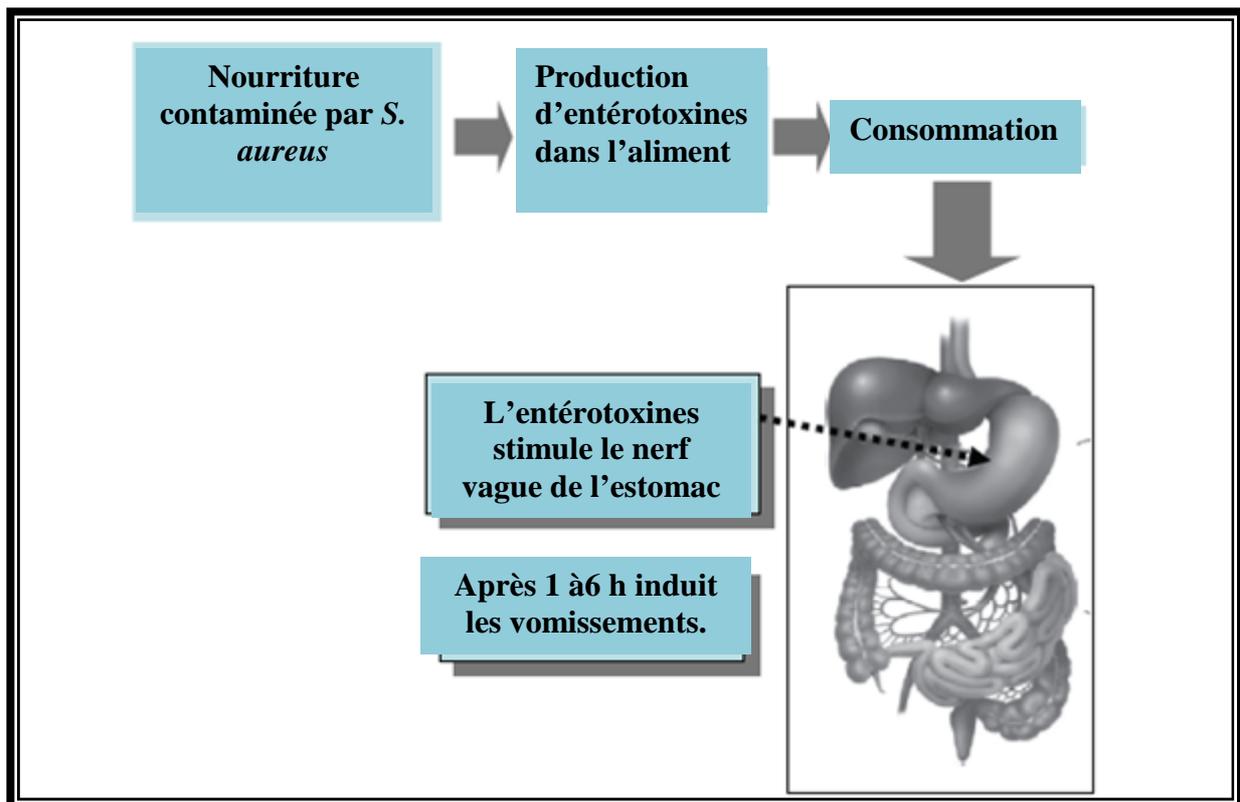
**Tableau IV** : Propriétés physique et chimique des entérotoxines staphylococciques (Jay *et al.*, 2005)

Entérotoxines staphylococcique (SE)	Dose émétique	PM (Da)	Point isoélectrique	Année d'identification
SEA	5	27100	6,8	1960
SEB	5	28366	8,6	1959
SEC1	5	34100	8,6	1967
SEC2	5-10	34000	7,0	1964
SEC3	<10	26900	8,15	1964
SED	20	27300	7.4	1979
SEE	10-20	29600	7,0	1971
SEG	-	27043	-	1992
SEH	<30	27300	5,7	1995
SEI	Faible	34.928	-	1998
SEJ	-	-	-	1998
SEK	-	26000	7,0-7,5	2001
SEL	-	-	-	2001

### 3.1. Mode d'action

Les entérotoxines staphylococciques diffèrent des autres entérotoxines du fait qu'elles possèdent des propriétés superantigéniques et qu'elles n'agissent pas directement sur les cellules de la muqueuse intestinale, elles ont une double action:

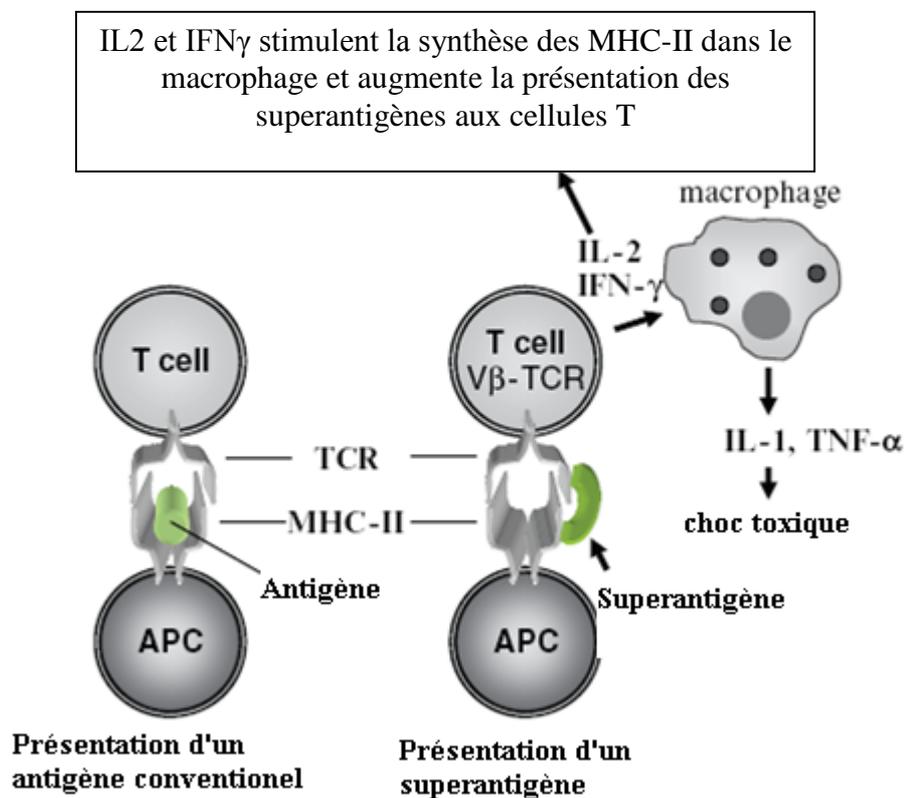
-Elles stimuleraient des récepteurs spécifiques d'entérotoxines localisés au niveau du tractus gastro-intestinal, ce stimulus activerait le centre nerveux émétique, via des fibres sensibles du nerf vague, ce qui entrainerait des vomissements violents (Sutra, 1998)



**Figure 10 :** Mécanisme de pathogénicité d'une intoxication due à une entérotoxine staphylococcique (Bhunia, 2008).

- Toutes les entérotoxines staphylococciques liées à des syndromes de chocs toxiques sont des superantigènes bactériens, ce sont des molécules capables de stimuler une population de lymphocytes T, beaucoup plus importante que celle stimulée par les antigènes conventionnels. Ces derniers nécessitent des cellules T CD4 qui facilitent leur contact avec le récepteur d'antigènes des lymphocytes T (TCR) et la molécule Classe II du complexe d'histocompatibilité majeur MHC. Les superantigènes quant à eux sont des molécules bifonctionnelles qui se fixent aux molécules de classe II du

MHC et sur les récepteurs TCR via leur chaînes  $\beta$  ( $V\beta$ ) sans intermédiaire (Figure 11), et cette interaction TCR-enterotoxine- molécules classe II du MHC stimule les macrophages, ce qui conduit à la production des Cytokines (IL1, IL2,  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ), une surabondance de IL2 et de  $IFN-\gamma$  induit une surexpression du MHC-molécules-classe II dans le macrophage, qui à son tour fixe plus de molécules de superantigènes (active plus de cellules T). La synthèse des cytokines semble être la cause de la plupart des symptômes des gastroentérites staphylococciques (Zang et Stewart, 2001; Le loir *et al.*, 2003; Jay *et al.*, 2005; Bhunia, 2008).



**Figure 11:** Mécanisme d'action d'un superantigène d'une entérotoxine staphylococcique (Bhunia, 2008).

### 3.2. Les toxi-infections alimentaires :

Une toxi-infection alimentaire staphylococcique (TIA) est une intoxication due à l'ingestion d'une ou de plusieurs entérotoxines produites dans un aliment contaminé par un staphylocoque (Kérouanton *et al.*, 2007). La dose infectieuse d'entérotoxine

staphylococcique est d'environ 1ng / g de nourriture, ce taux est atteint lorsque la population de *S. aureus* excède les  $10^5$  cellules/ g. La concentration d'enterotoxine SEA requise pour provoquer une TIA chez l'être humain est de 200ng /kg. SEB est également très toxique, une dose de 0.4µg/kg est susceptible de provoquer un choc toxique chez l'humain (Bhunja, 2008).

Les Syndromes typiques associés aux TIA apparaissent généralement 2 à 6 heures après ingestion et se traduisent par des vomissements avec ou sans diarrhées, crampes abdominales, généralement pas de fièvre quelque fois une légère hyperthermie ou bien au contraire une hypothermie. Des complications peuvent survenir en fonction de la dose de l'entérotoxine ou bien de la sensibilité de l'individu et de son état de santé : déshydratation, irritations musculaires, hypotension, état de choc, cependant la mortalité est très rare et n'atteint que les individus sensibles aux méfaits de la déshydratation (Jay *et al.* 2005; Zang et Stewart, 2001).

*Staphylococcus aureus* est un contaminant fréquent du lait cru, ce dernier et ses dérivés font partie des principaux véhicules de ce germe, ils ont été impliqués dans des cas de TIA depuis plus de 100 ans. D'après De Buyser *et al.*, (2001) un rapport annuel sur les intoxications alimentaires fait sur 7 pays indique que le lait et les produits laitiers, sont impliqués dans 1 à 5% des cas d'intoxications alimentaires.

La contamination du lait cru résulte le plus souvent des conditions d'hygiène mal maîtrisées (De Buyser *et al.*, 2001; Elliot, 2001).

La contamination peut être d'origine humaine : les fosses nasales sont considérées comme le site de portage le plus fréquent mais le germe peut être également localisé au niveau de la peau et la gorge, ou être d'origine animale, *S. aureus* est l'un des principaux agents responsables de mammites, il peut donc naturellement se retrouver dans le lait (Letondeur *et al.*, 1997; Elliot, 2001). Dans deux cas de TIA collective aux Brésil incriminant du fromage et du lait cru dans lesquels  $2,4 \cdot 10^3$  et plus de  $2 \cdot 10^8$  UFC/g de Staphylocoques ont été respectivement détectés; dans le premier cas l'enquête a conclu à une contamination humaine et dans le second aux mammites des troupeaux (Do Carmo *et al.*, 2002).

## **4. Les mammites :**

### **4.1. Définition**

Une mammite est une infection mammaire avec ou sans inflammation, d'au moins un quartier, due à la prolifération d'un ou de plusieurs types de microorganismes dans la glande. (Charron, 1988; Mathieu, 1998)

Les mammites causées par *S. aureus* peuvent être cliniques ou sub-cliniques. (Taponen et Pyorala, 2008). *S. aureus* serait responsable de 20 à 40% des infections mammaires sub-cliniques et de 15 à 30% des infections cliniques (Sutra, 1998).

Une mammite clinique est exprimée par la production d'un lait anormal (changement de texture, de couleur et d'odeur), et par un quartier infecté montrant des signes cliniques révélateurs : gonflement, chaleur et douleur à la palpation, dans les cas aigus, ces signes sont accompagnés d'hyperthermie, anorexie, affaiblissement de l'état général. Ces mammites cliniques peuvent être très sévères et mener à la mort de l'animal (Gruet *et al.*, 2001).

Une mammite sub-clinique (qui représente plus de 95% des cas de mammites) n'est pas une menace directe pour la vie de l'animal, le signe prépondérant est l'augmentation du nombre de cellules somatiques (NCS), ce qui mène à une diminution importante de la production de lait et donc à une importante perte financière de l'éleveur (Luquet, 1985; Fox *et al.*, 2001; Nickerson, 2008; Taponen et Pyorala, 2008).

### **4.2. Traitement :**

Les mammites dues à *S. aureus* sont difficiles à traiter particulièrement lorsqu'elles sont détectées tardivement, *S. aureus* pénètre les tissus de la glande mammaire formant des abcès profonds, il est capable de survivre à l'intérieur des cellules après phagocytose. (Baselga *et al.*, 1994; Taponen et Pyorala, 2008)

Pour qu'un traitement soit efficace, la concentration thérapeutique de l'antibiotique doit être atteinte dans le site de l'infection, ainsi, les antibiotiques sont administrés soit *via* la voie intra-mammaire (directement dans la mamelle) ou par voie parentérale (dans la circulation sanguine) selon leur potentiel de distribution à travers la mamelle (tableau V) (Gruet *et al.*, 2001).

Les chances de guérison varient largement entre 15 et 85% selon divers facteurs dont : Le nombre de lactations et la quantité de cellules somatiques avant le traitement (Taponen, Pyorala, 2008).

Les traitements utilisés en médecine vétérinaire sont constitués d'antibiotiques de différentes classes, l'utilisation de ces antibiotiques comme agents thérapeutiques ou à titre préventif favorise l'apparition de souches résistantes, la résistance des souches pathogène chez les animaux est considérée comme étant une menace d'où l'intérêt croissant pour des recherches de transmission éventuelle de ces pathogènes à l'Homme (Goni *et al.*, 2004).

**Tableau V** : Classification des antibiotiques selon leur potentiel de distribution dans la mamelle après une administration parentérale ou intra-mammaire (**Gruet *et al.*, 2001**).

	<b>parentérale</b>	<b>Intramammaire</b>
Bonne distribution	Quinolones Sulfanilamide Erythromycine Oleandomycine Tylosine Spiramycine	Quinolones Sulfamides Erythromycine Oleandomycine Spyramycine Lyncomycine Ampiciline Amoxiciline Cephalexine Novobiocine Rifamycine
Distribution limitée	Penicilline G Cloxacilline Ampicilline Amoxicilline Cephalosporines Tetracycline Novobiocine Rifamycine	Penicilline G Cloxacilline Oxaciline Cephoxazole Cephalonium Tetracycline
Distribution faible	Néomycine Kanamycine Aminocidine Gentamycine Polymixine Vancomycine	Bacitracine Néomycine Kanamycine Aminosine Gentamycine Polymixine

# *PARTIE PRATIQUE*

*MATERIEL ET  
METHODES*

## **I. Isolement et purification des lactocoques**

### **I.1. Provenance des échantillons de lait**

Les échantillons de lait de chèvre et de vache proviennent de différentes régions de la wilaya de Bejaïa. Les échantillons de lait sont prélevés dans des conditions d'hygiène rigoureuses dans des flacons de 250 ml stériles. Ces derniers sont transportés immédiatement au laboratoire pour analyse. Dans le cas des zones lointaines, les échantillons sont conservés dans une glacière, lors de leur transport au laboratoire.

### **I.2. Isolement**

Le lait subit des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  un volume de 1 ml des dilutions est ensemencé en surface sur milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) puis l'excès est aspiré. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48 heures (figure12). Après incubation, les colonies à coloration de Gram positif sous forme de cocci dépourvues de catalase sont retenues.

### **I.3. Purification**

Les bactéries lactiques isolées sont purifiées sur milieu M17 gélosé après plusieurs repiquages. En moyenne 3 à 4 repiquages successifs sont réalisés pour assurer la pureté des souches. Des examens macroscopiques (couleur, taille et forme des colonies), microscopiques (morphologie, mode de regroupement des cellules et coloration de Gram) et le test de la catalase sont effectués.

Les bactéries ayant un aspect homogène en coccie Gram positif et catalase négative sont retenues.

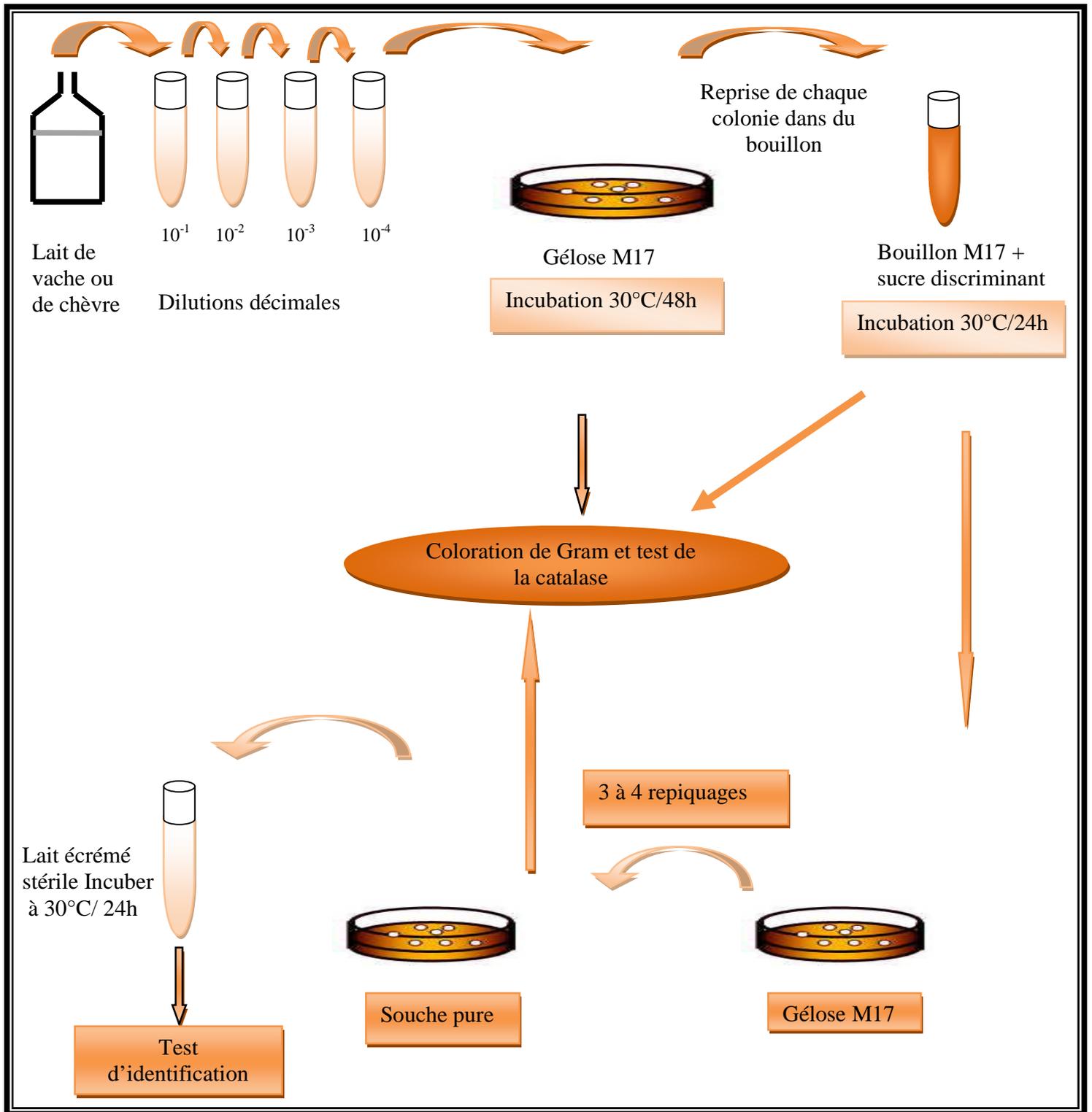
### **I.4. Identification**

Les souches retenues sont repiquées sur du bouillon M17, puis incubées à 30°C pendant 18 heures. Les tests physiologiques et biochimiques utilisés pour identifier les souches sont rassemblés dans le tableau I, en se référant aux données de Kimoto *et al.* (2004) et Teuber et Geis (2006).

Une souche de référence de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* fournie par le laboratoire Biosciences de l'université d'Aix Marseille II est intégrée dans les tests d'identification, en parallèle avec les souches de lactocoques isolées.

**Tableau VI : Identification des souches de lactocoques**

Test	Mode opératoire	Réaction positive
<b>Type fermentaire</b>	Le bouillon M17 est ensemencé en présence d'une cloche de Durham, et incubé à 30°C/24h.	Apparition de bulles de gaz dans la cloche de Durham
<b>Croissance à différentes températures</b>	Le lait écrémé ensemencé est incubé à 10°C/1-7 jours, 40°C/24h, et 45°C/24h.	Coagulation du lait
<b>Tolérance à la salinité</b>	Du bouillon M17 à des concentrations de 2%, 4% et 6,5% NaCl est ensemencé et incubé à 30°C/24h.	Trouble du bouillon.
<b>Tolérance au pH alcalin</b>	Du bouillon M17 alcalinisé à pH 9,6 est ensemencé et incubé à 30°C/24H	Trouble du bouillon
<b>Culture sur lait Bleu de Schermann</b>	9 ml de lait additionné de 1 ml de bleu de méthylène à 1% sont ensemencés et incubés à 30°C/24h.	Réduction du bleu de méthylène. (Decoloration)
<b>Hydrolyse de l'arginine</b>	9 ml de bouillon de culture à l'arginine (annexes) sont ensemencés et incubés à 30°C/1-7 Jours.	La production d'ammoniac est mise en évidence par le réactif de Nessler (coloration rouge orangé).
<b>Fermentation des glucides</b>	9 ml de milieu pour fermentation (annexes) additionnés de sucres à une concentration finale de 2%, et d'un indicateur coloré (rouge de phénol 1%) sont ensemencés avec la suspension bactérienne préparée au préalable. L'incubation se fait à 30°C/ 1 à 7 jours	le virage de la couleur du rouge de phénol au jaune indique la fermentation du sucre.



**Figure12** : Isolement et purification des souches de lactocoques à partir de lait de vache et de chèvre.

### **Préparation des suspensions bactériennes pour la fermentation des sucres :**

Après culture sur bouillon M17 à 30°C pendant 18 heures, les cellules subissent trois lavages avec de l'eau physiologique stérile, par centrifugation à 5000 rt/min (centrifugeuse Sigma 2-1 K), pendant 5 min. Le culot obtenu est remis en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

La fermentation des glucides (maltose, raffinose, salicine, mélibiose, cellobiose et sorbose) par les souches isolées est étudiée sur milieu M17 sans sucre additionné du sucre cible, en présence d'un indicateur coloré, le rouge de phénol 1%; le virage de la couleur du rouge au jaune indique la fermentation du sucre. (Guiraud et Galzy, 1980)

### **I.5. PCR et Séquençage de l'ARN 16S de la souche de lactocoque retenue**

L'identification de la souche retenue a été effectuée au laboratoire Biosciences de l'université d'Aix Marseille II par M<sup>lle</sup> Titeli F. comme suit

- 2ml d'une culture de 18h de la souche de lactocoque retenue ont été centrifugé à 5000g /10min, le surnageant est jeté. Le culot est mis en suspension dans 180µl de tampon enzymatique de lyse.
- La suspension est incubée à 37°C/30min au bain marie.
- Addition de 25µl de protéinase K et 200µl de tampon AL (sans éthanol), mélanger bien ;
- Incubation à 56°C/ 30min au bain marie ;
- Addition de 200µl d'éthanol (96-100%), il est important que l'échantillon soit bien mélangé pour avoir une solution homogène.
- Le mélange est pipeté dans une colonne placée dans un tube de collection de 2ml, puis centrifugé à 6000g/1min, le filtrat est jeté ;
- 500 µl de tampon AW1 sont ajouté, puis centrifugé à 6000g/ 3min, le filtrat est jeté ;
- 500µl de tampon AW2 sont ajouté, puis centrifugé à 14000g/3min, répéter l'opération une fois, le filtrat est jeté ;
- Le tampon AE est ajouté, laisser 1min à température ambiante, puis centrifuger à 6000g/min pour éluer avec 150µl de LAE ;
- Centrifuger à 6000g/1min, faire une dilution au 1/10 dans l'eau distillée.

- Mesurer la DO à 260 nm pour avoir la concentration de l'ADN extrait, et lire le rapport DO260/DO280 pour avoir le degré de pureté ou de contamination protéique.

### **I.5.2. PCR :**

On utilise deux couples d'amorces : F515/R930 et F915/R1406.

**OIF515** 5'-GTGCCAGC(AC)GCCGCGG-3'

**OIF915** 5'- A(GT)GAATTGACGGGG(AG)C

**OIR1406** 5'- ACGGGCGGTGTGT(AG)C-3'

**OIR930** 5'- G(CT)CCCCGTCAATTC(AC)T

Dans des Eppendorfs préparer le mixte suivant :

- 5µL de dNTP (250µM) ; 5µl de tampon 10X ; 5µ MgCl<sub>2</sub> ; 2µl d'amorce F915 (25mM) ; 2µl d'amorce R1406 (25 mM) ; 1µl de matrice (échantillon d'ADN extrait) ; 0,25 µl de Taq polymérase ; 29,75 µl d'eau ultra pure stérile ; 5µL de dNTP (250µM) ; 5µl de tampon 10X ; 5µ MgCl<sub>2</sub>
- 2µl d'amorce F515 (25mM) ; 2µl d'amorce R930 (25 mM) ; 1µl de matrice (échantillon d'ADN extrait) ; 0,25 µl de Taq polymérase ; 29,75 µl d'eau ultra pure stérile

Passer au thermocycleur selon le programme suivant :

- Dénaturation : 94°C/10 min
- 30 cycles, 94°C/30sec
- 30 s à 42,2°C (F515/R930) et 53°C (F915/R1406) G (T=48°C, G=7°C)
- 45 s à 72°C
- Temps additionnel au thermocycleur 10min à 72°C.

Après la PCR, une migration sur gel d'agarose est réalisée pour voir si les deux fragments ont été bien amplifiés. Le produit de PCR subit un séquençage de l'ARN 16S.

## II-Isolement et purification des souches de *Staphylococcus aureus*

### II.1. Isolement

Les staphylocoques ont été isolés à partir des laits de vache et de chèvre mammites de la région de Béjaïa (tableau VII).

Deux souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline isolées de malades humains, ainsi que trois souches isolées de vaches saines ont également été utilisées.

**Tableau VII :** Origines des échantillons de lait utilisées.

Echantillons de lait	Région	Origine
Echantillons 1, 2, 3	Akbou	Vaches mammiteuse
Echantillon 4	Akbou	Chèvre mammiteuse
Echantillon 5	Ighzer amokrane	Chèvre mammiteuse
Echantillons 6, 7,8, 20	Ighil ouazoug	Vaches mammiteuses
Echantillons 9, 21, 22	Taghzouith	Vaches mammiteuses
Echantillon 10	Ighil ouazoug	Vache saine
Echantillons 11, 23	Oued Ghir	Vaches saines
Echantillon 12	Oued Ghir	Vache mammiteuse
Echantillon 13	Kharata	Vache mammiteuse
Echantillon 14	Melala	Vache mammiteuse
Echantillons 15, 16,17	Akbou	Vaches mammiteuses
Echantillons 18, 19, 24	Ighzer amokrane	Vaches mammiteuses

- **Purification des souches de *S. aureus* :**

1ml d'échantillon de lait estensemencé dans des tubes contenant 10 ml de milieu Giolitti et Cantoni additionné de tellurite de potassium, puis incubé à 37°C / 24h.

- Ensemencement en stries sur milieu Chapman à partir des bouillons d'enrichissement puis incubation à 37°C / 24h.
- Après 24h d'incubation, les colonies jaunes (mannitol +) obtenues sont repiquées sur gélose Chapman et incubées à 37°C / 24h.
- Par la suite, les colonies sont repiquées deux fois sur milieu Baird Parker par la méthode des stries.

## **II.2. Identification des souches :**

L'identification des souches de staphylocoques est effectuée sur les colonies présentant les caractéristiques de *S. aureus* sur milieu Baird Parker. Cette dernière est basée sur 4 tests principaux :

- 1 **La coloration de Gram.**
- 2 **Le test de la catalase**
- 3 **Le test de la coagulase :**
- 4 **Le test de la DNase**

- **Le test de la coagulase**

-Ensemencement à partir de 4 colonies caractéristiques sur milieu Baird Parker d'un bouillon BHI (cœur cerveau) puis incubation 24h à 37°C (au bain-marie).

-Dans des tubes à hémolyse stériles, on répartit 0,5 ml de plasma de lapin puis on dépose stérilement 0,5 ml de chaque tube de BHI présentant un trouble.

-Tous les tubes sont mélangés en douceur puis incubés à 37°C (Guiraud et Rosec, 2004). L'observation se fait toutes les 15 minutes durant une heure puis après deux heures.

Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum.

• **Le test de la DNase :**

-A partir des colonies caractéristiques sur Baird Parker, on ensemence une gélose à ADN par strie centrale incubation 24h à 37°C.

-La révélation de l'activité se fait en vaporisant à la surface de la gélose avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl). L'apparition d'une zone claire autour de la strie indique la présence d'une DNase (Guiraud et Rosec, 2004).

**III. Standardisation des inocula bactériens :**

**III.1. Préparation de l'inoculum standard des lactocoques :**

Afin de pouvoir comparer l'aptitude des différentes souches de *Lactococcus lactis* à produire des substances antimicrobiennes, une standardisation des conditions de culture est indispensable, Pour cela les inocula des souches testées sont standardisés à  $10^9$  cellules/ml, cultivées dans du bouillon M17 à 30°C pendant 18h.

A partir d'une culture fraîche, obtenue dans 9ml du bouillon M17, un ensemencement est réalisé sur le même milieu gélosé.

Après 48h d'incubation à 30°C, quatre colonies bien isolées et bien distinctes ont été repiquées dans un tube à essai de 9ml de bouillon M17, puis incubées à 30°C pendant 18h.

Au terme de l'incubation, des dilutions décimales ont été réalisées dans de l'eau physiologique ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), A partir des dilutions préparées ( $10^{-5}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1ml de chaque dilution a été ensemencé en masse dans une gélose M17, puis incubé à 30°C pendant 48h. Au terme du temps d'incubation les colonies sont dénombrées. (figure 13)

**III.2. Préparation de l'inoculum standard de *S. aureus* :**

L'activité de tout agent antimicrobien est dépendante de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée (Leroy et De Vuyst, 2000), ainsi, l'inoculum de la souche de *S. aureus* a été standardisé.

A partir d'une culture fraîche, obtenue sur bouillon nutritif, un ensemencement par strie est réalisé sur milieu Chapman, après incubation à 37°C / 24h, les colonies sont prélevées et reprises dans un tube d'eau physiologique, jusqu'à avoir la densité optique

fixée: 0,500 à 625 nm (specro Shimadzu UV mini 1240). Ensuite des dilutions décimales ont été réalisées dans de l'eau physiologique ( $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ ), à partir des dilutions préparées ( $10^{-5}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1ml de chaque dilution a été ensemencé en masse dans une gélose Chapman, puis incubé à 37°C / 24h.

Au terme de l'incubation le dénombrement des colonies a été réalisé. (Figure 14)

#### **IV. Antibiogramme de la souche de *S. aureus***

Dans le but de rechercher une éventuelle résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées à partir des laits mammites, toutes les souches de *Staphylococcus aureus* identifiées ont fait l'objet d'un antibiogramme standard sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CA-SFM (2008).

Pour étudier la résistance du *Staphylococcus aureus* à la méthicilline, il est recommandé d'utiliser la céfoxitine comme marqueur phénotypique pour la détection de la résistance et d'incuber à 30°C au lieu de 37°C (Smyth et Kahlmeter, 2005; Fernandes *et al*, 2005).

##### **IV.1. Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture pure et fraîche de 24 heures, les colonies de *S. aureus* isolées sont raclées à l'aide d'une anse de platine, l'anse est ensuite déchargée dans 9 ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, les inocula sont ajustés jusqu'à obtenir une DO de 0,50 à 625 nm (environ  $10^8$  cellules/ml). Une dilution à  $10^{-1}$  est effectuée, pour avoir  $10^7$  cellules/ml.

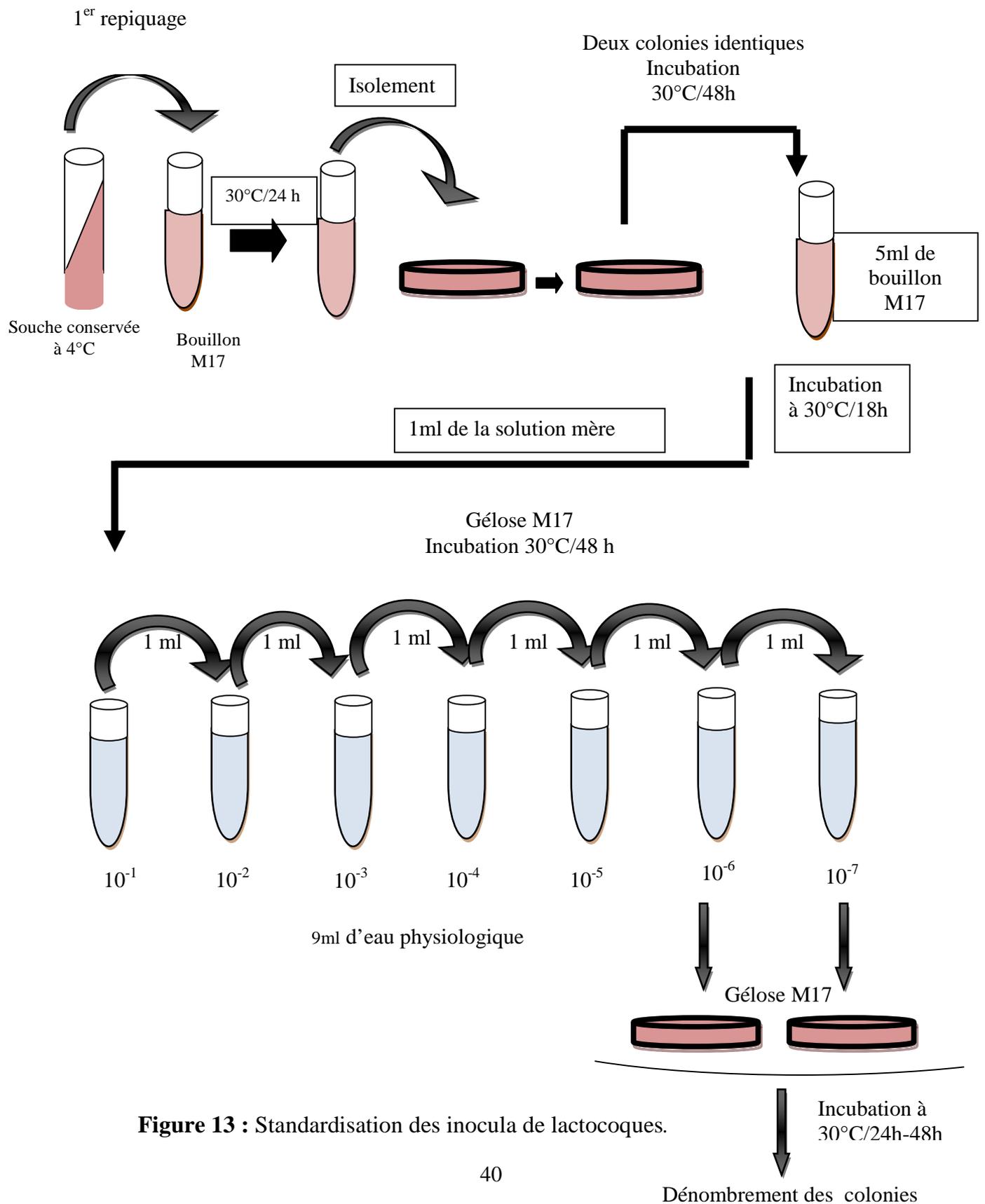


Figure 13 : Standardisation des inocula de lactocoques.

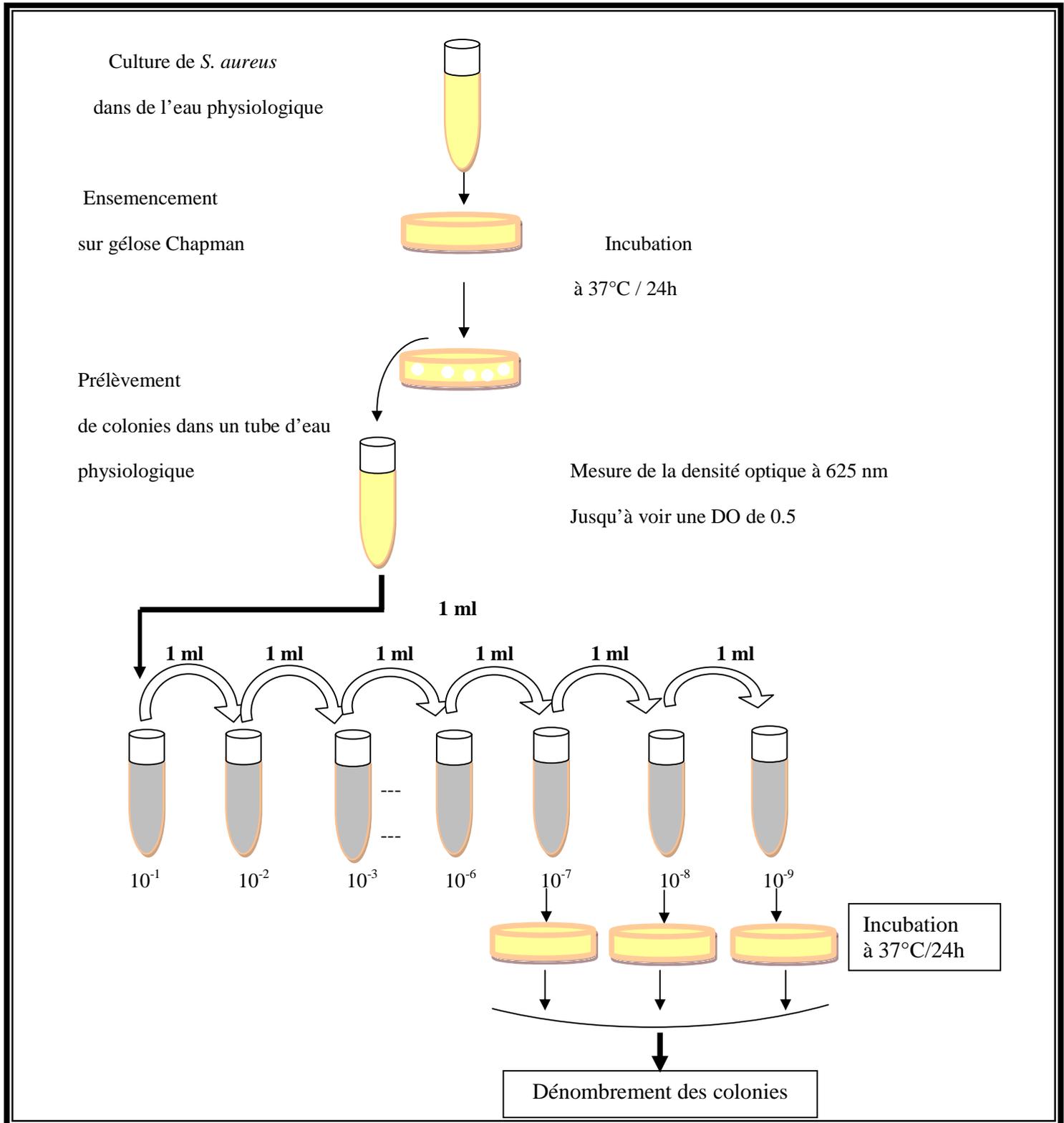


Figure 14 : Standardisation de l'inoculum de *S. aureus*.

#### IV.2.. Ensemencement (CA-SFM, 2008)

- 1 Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne à  $10^7$  cellules/ml
- 2 Essorer l'écouvillon en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- 3 Sur une boîte de Pétri présentant 4 mm d'épaisseur de gélose Mueller Hinton, frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose de haut en bas et en stries serrées
- 4 Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de  $60^\circ$  à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- 5 Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- 6 Déposer les disques d'antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton et incuber à  $30^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 heures.

#### IV.3. Lecture

Les souches de *S. aureus* sont testées vis-à-vis des antibiotiques suivant : la Pefloxacine, la gentamicine l'amikacine, l'ampicilline, l'amoxicilline, la cefalexine, la cefotaxime et la cefoxitine par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton comme indiquée ci-dessus. L'incubation est réalisée à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures.

Après incubation, on mesure avec précision le diamètre de la zone d'inhibition. L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) est effectuée selon les recommandations du CA-SFM.

Les souches de *S. aureus* présentant des diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis de la cefoxitine inférieurs à 25 mm sont considérées comme résistantes (CA-SFM, 2008).

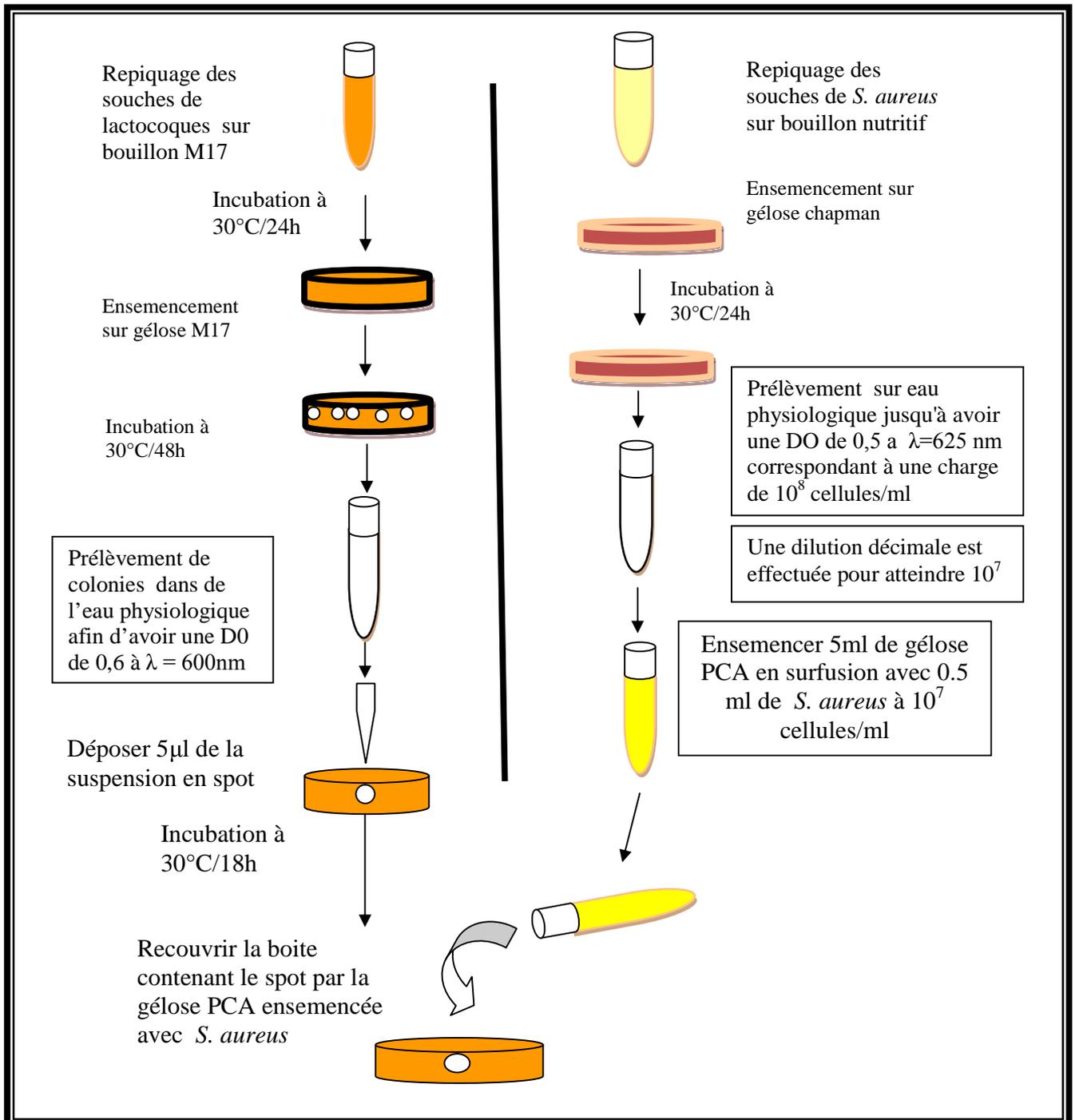
## V. Recherche de l'activité antibactérienne des souches de *lactocoques* envers *S. aureus*

Afin de mettre en évidence l'action antibactérienne des lactocoques isolés, à l'égard de *S. aureus*, pour les utiliser plus tard, éventuellement comme barrière pour ce germe dans des laits fermentés ou des fromages, plusieurs méthodes de détection de l'activité antimicrobienne sont utilisées :

### V.1. Test des spots

L'activité antibactérienne des lactocoques à l'égard de *S. aureus* est mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test de spots de Schillinger et Lucke, (1989).

Après avoir coulé les boîtes de Pétri avec la gélose M17 (solidifiées et séchées), 5µl de la suspension bactérienne de la souche de lactocoque (obtenue après 18 h d'incubation à 30°C) sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées à l'air ambiant (près du bec benzène) pendant 30 min environ puis incubées à 30°C/18h (Bayoub *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2007). Après la période d'incubation, la gélose est recouverte de 5 ml d'une gélose semi-molle de PCAensemencée avec 0,1ml d'une culture fraîche de la souche *S. aureus* à  $10^7$  UFC/ml. Les boîtes sont incubées à 37°C/24h. Au terme de la période d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré.



**Figure 15 : Test des spots**

## **V.2. Test de l'activité du surnageant de culture de lactocoques :**

### **V.2.1 Test des puits :**

Dans le but de rechercher l'activité antimicrobienne dans les surnageants natifs et neutralisés, le test est réalisé par la méthode des puits sur milieu Mueller Hinton (Tagg et McGiven, 1971; Elegado *et al.*, 1997; Ghrairi *et al.*, 2005).

#### **• Préparation des surnageants de culture des lactocoques :**

Une culture de lactocoques est réalisée par ensemencement d'un bouillon M17 et incubée pendant 18h à 30°C. La culture est centrifugée à 8000g pendant 15 minutes à 4°C (Settanni *et al.*, 2005), l'opération est répétée deux fois. Les surnageants récupérés sont testés pour leurs activités envers les souches de *S. aureus*.

9ml de gélose Mueller Hinton en surfusion inoculés avec 1ml d'une culture de *S. aureus* S7 (10<sup>6</sup> cellules/ml) sont coulés à la surface d'une gélose Mueller Hinton préalablement coulée et solidifiée dans une boîte de Pétri. Après solidification, des puits de 6mm de diamètre et de 4mm de profondeur sont creusés dans la gélose à l'aide d'une baguette en verre stérile. Le fond des puits est scellé par une goutte de gélose blanche.

#### **V-2-2-Concentration du surnageant :**

Etant donné que l'activité du surnageant pourrait être réduite par un effet de dilution, une concentration est réalisée. Le surnageant est concentré 5 fois, sous vide à 50°C, à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor Buchi R14). Le test d'activité du surnageant concentré est réalisé après filtration sous vide à travers une membrane d'acétate de cellulose (0,22 µm, filtre millipore).

### **V-2-3- désorption des substances antibactériennes de la paroi des souches productrices :**

Afin d'éviter toute éventuelle adsorption de substance antibactérienne aux cellules de lactocoques, on procède à un re-largage de la substance éventuellement présente, la suspension bactérienne de lactocoques (obtenue après 18h d'incubation à 30°C) est acidifiée en ajustant le pH à 3,5 avec du HCl 37 %, puis incubée à 37°C pendant 2h. Après incubation, la suspension bactérienne est neutralisée en ajustant le pH à 7,0 avec du NaOH 1N stérile. (Guerra et Pastrana, 2002)

La recherche de l'activité antimicrobienne du surnageant est réalisée par la méthode des puits sur le milieu Mueller Hinton décrite précédemment.

## **VI. Cinétique d'acidification des souches de lactocoques**

Les souches retenues sur la base de leur activité antibactérienne et de leur croissance ont fait l'objet d'un suivi de leur activité acidifiante.

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre, d'une part, l'évolution du pH des cultures pures au cours du temps et d'autre part, à doser simultanément l'acidité Dornic.

### **VI.1. Mesure du pH**

L'évolution du pH des cultures sur lait écrémé est suivie par mesure du pH à l'aide d'un pH-mètre, toute les deux heures pendant 24h. (Bouquient *et al*, 1988)

### **VI.2. Détermination de l'acidité titrable**

L'acidité Dornic est mesurée par la neutralisation de 10 ml de lait, par l'hydroxyde de sodium (N/9), en présence d'un indicateur de pH, la phénophtaléine.

Le mélange est titré jusqu'à apparition d'une couleur rose pâle persistante. Cette acidité est exprimée en degré Dornic (tel que 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait, ce qui est équivalent à 0,1ml d'hydroxyde de sodium nécessaire pour assurer le virage de la couleur vers le rose. (Bouquient *et al*, 1988)

## VII. Culture mixte dans du lait écrémé de la souche de lactocoque retenue et *S. aureus* :

L'étude de l'antagonisme in vitro de la souche de lactocoque à l'égard de la souche de *S. aureus* est effectuée en culture mixte dans du lait écrémé, afin d'évaluer le potentiel inhibiteur des lactocoques lorsqu'ils cohabitent avec *S. aureus* dans un contexte qui se rapproche du fromage dans lequel ils seront amenés à être utilisés.

Dans le but de déterminer le taux d'inoculum pour lequel la souche de lactocoque possède le maximum d'activité dans le lait, deux taux de cette dernière sont testés à savoir :  $10^8$  et  $10^9$  cellules /ml. Pour cela les cultures mixtes sont réalisées comme suit (figure 16) :

8ml de lait écrémé stérile sontensemencés en même temps avec *S. aureus* et le lactocoque pour atteindre un taux de  $10^5$  cellules /ml pour *S. aureus* et  $10^8$  ou  $10^9$  cellules/ml pour le lactocoque. Des cultures témoins (cultures pures)ensemencé avec un taux identique de *S. aureus* ( $10^5$  cellules/ml) seule sont réalisées dans les mêmes conditions. Les cultures sont incubées à 37°C, et la croissance de *S. aureus* est suivie aussi bien pour les cultures pures que les cultures mixtes par des dénombrements par comptage des colonies sur gélose de Chapman.

Les prélèvements sont effectués au moment de l'ensemencement (Temps 0), puis toutes les 2h pendant 24h d'incubation.

La croissance de *S. aureus* en culture mixte a été comparée à sa croissance en culture pure.

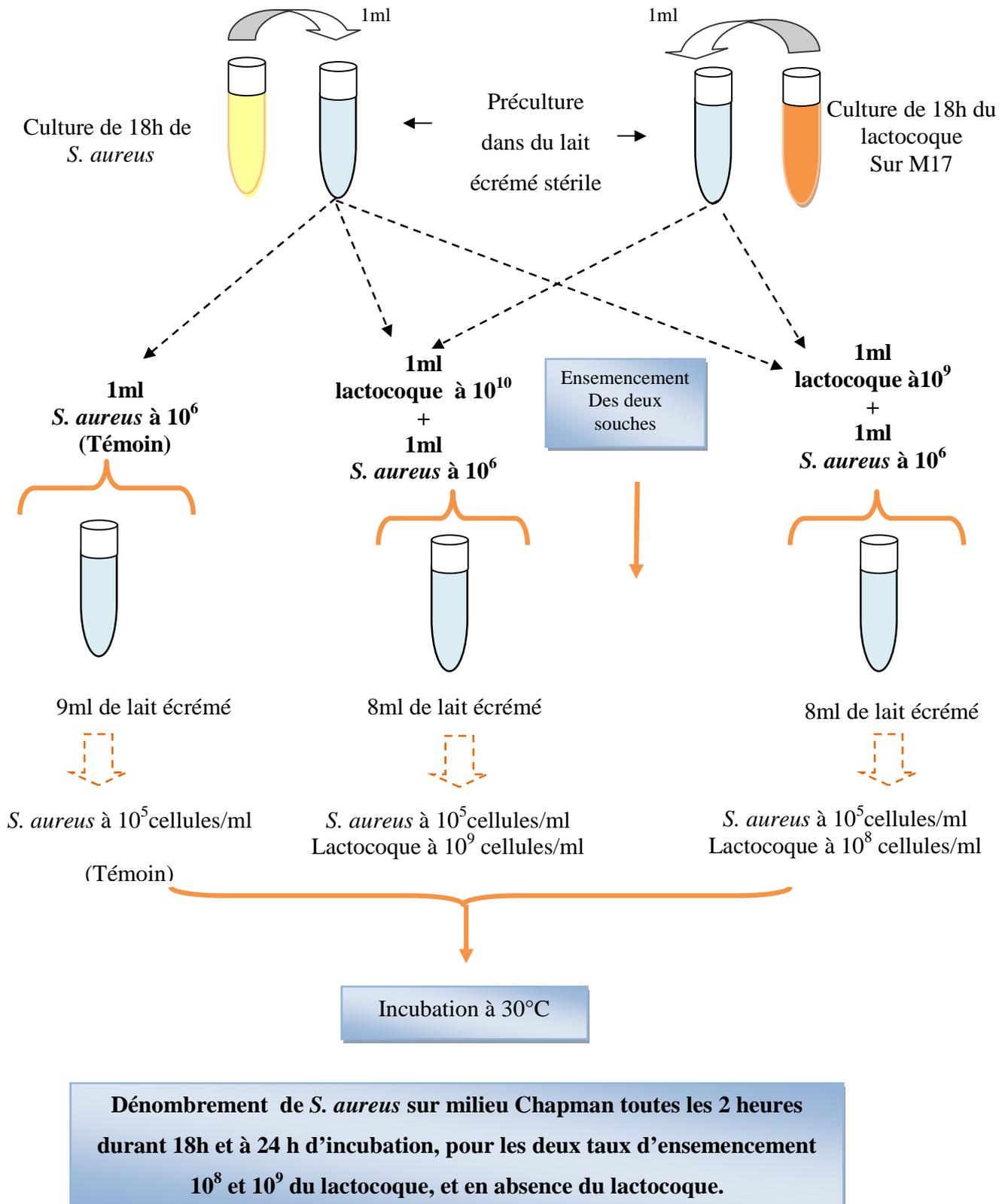


Figure 16 : Culture mixte de *S. aureus* et lactocoque.

Au terme des tests d'activité, la souche de lactocoque est sélectionnée pour la suite des travaux. Afin de travailler avec un même inoculum du lactocoque de  $10^9$  cellules /ml, on fixe la DO de 0,600 à une longueur d'onde  $\lambda = 600$  qui correspond à  $10^9$  cellules/ml, en travaillant toujours dans les mêmes conditions.

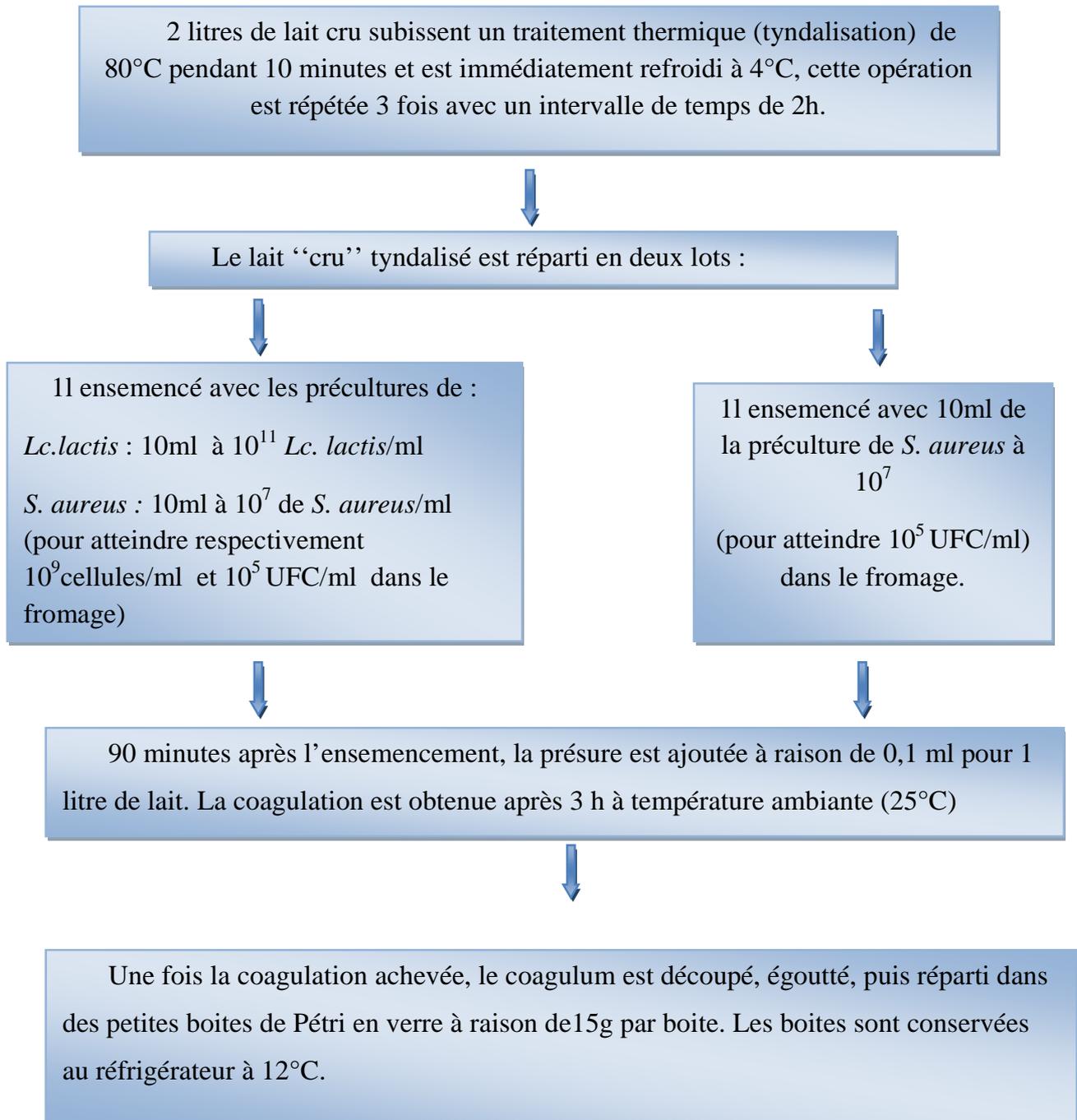
### **VIII. Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* résistant aux antibiotiques dans le fromage frais (mis au point au laboratoire)ensemencé avec le lactocoque retenu**

La présence de *S. aureus* dans les laits destinés à la fabrication de fromage est préoccupante surtout lorsqu'il s'agit d'un procédé de fabrication de fromage au lait cru. Dans le but d'étudier le pouvoir du lactocoque à éliminer *S. aureus* dans le fromage, nous avons suivi l'évolution de la croissance de ce dernier dans un fromage frais fabriqué à partir de lait stérile fermenté par la souche de lactocoque, contaminé avec *S. aureus*.

#### **VIII.1. Fabrication du fromage frais**

Le lait utilisé pour la fabrication du fromage frais est un lait de vache saine, d'une ferme située à Ighil Ouazoug, Béjaia.

La fabrication du fromage a été répétée 4 fois, dans les mêmes conditions, (figure 17)



**Figure17** : Etapes de fabrication du fromage frais inoculé avec *S. aureus* multi-résistant et la souche de lactocoque retenue

La croissance de *S. aureus* dans le fromage est suivie par un dénombrement sur gélose Chapman tous les jours pendant 7 jours puis au 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour, de chaque échantillon de fromage (*S. aureus* seul et *S. aureus* + lactocoque). Les mêmes étapes ont été respectées pour les 4 répétitions

Une comparaison étayée par une étude statistique a été faite entre l'évolution de *S. aureus* dans le fromage, seul et en présence de la souche de lactocoque.

### **Etude Statistique**

Les tests effectués dans cette étude statistique sont le test de l'analyse des variances de Fisher-Snedecor et le test de Student : comparaison des moyennes de deux échantillons appariés.

Signification des symboles utilisés

$CM_f$  : Carré moyen factoriel.

$CM_r$  : Carré moyen résiduelle.

Ddl : Degré de liberté

$F_{the}$  : Valeur critique déterminée à partir de la table de distribution de Snedecor :  $p= 0,95, 0,99$  ou  $0,999$  .

$F_{obs}$  : Valeur du facteur de Fisher-Snedecor observée ou calculée.

$SCE_f$  : Somme des carrés des écarts factoriels.

$SCE_r$  : Somme des carrés des écarts résiduels.

$SCE_t$  : Somme des Carré des écarts totaux.

$t_{obs}$  : Valeur t calculée.

$t_{the}$  : Valeur t de la table de Student.

$V_f$  : Variation factorielle

$V_r$  : variation résiduelle.

$V_t$  : Variation totale.

La différence entre les résultats est dite significative lorsque les valeurs de  $F_{obs}$  et  $T_{obs}$  sont supérieures ou égales à celles de  $F_{the}$  et  $t_{the}$ .

*RESULTATS  
ET DISCUSSION*

## I. Isolement et identifications des lactocoques

### I.1. Isolement des souches de lactocoques :

59 souches de bactéries lactiques ont été isolées, une présélection a été faite sur la base d'observations macroscopiques et microscopiques des colonies ainsi que sur des tests préliminaires (Gram, catalase, production de gaz)

28 souches qui correspondaient au profil recherché: cocci Gram positif, Catalase négative, ne produisant pas de gaz, ont été retenues.

Les souches non retenues ont présenté les profils suivants :

5 souches en forme de longs bacilles Gram positif, catalase négative, non productrices de gaz (homofermentaires)

7 souches en forme de petits bacilles Gram positif disposés en petites chainettes, catalase négative et productrices de CO<sub>2</sub> (hétéro-fermentaires)

19 souches en forme de coques Gram positif, regroupées en amas parfois en chainettes, catalase négative, productrices de gaz, (hétéro-fermentaires).

**Tableau VIII** : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches retenues.

Souches	Colonies		Gram	Cellules	
	couleur	aspect		Forme	Mode de regroupement
S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10,S11, S12, S13, S14	Blanchâtre	Colonies de taille moyenne, à contour régulier	+	Cocci	Isolées en diplocoques ou en petites chainettes
S15, S16, S17, S18, S19, S20.	Blanchâtre	Colonies de petite taille, bombées et crémeuses	+	Cocci	Longues chainettes

S21, S22, S23, S24	Blanchâtre	Colonies de taille moyenne, à contour régulier	+	Cocci	En diplocoques, petites chainette, ou en amas
S25, S26, S27, S28.	Blanchâtre	Colonies de tailles moyennes A contour régulier	+	Cocci	En diplocoques ou en chainettes de longueurs variables.

Sur les 59 souches isolées, 34 ont été isolées à partir de lait de chèvre, et 25 à partir de lait de vache, les bactéries lactiques les plus rencontrées sont surtout des coques 79,66%, les coques homofermentaires représentaient 47,46% et les coques hétérofermentaires représentaient 32,20% du total des bactéries isolées. Les bacilles ne représentent que 20,34% des bactéries isolées dont 8,47% sont des bacilles homofermentaires et 11,86% des bacilles hétérofermentaires.

Diverses études de la biodiversité des écosystèmes bactériens du lait cru ont rapporté que les lactocoques dominaient la flore lactique totale. En effet, Centeno *et al.* (1996), ont étudié la biodiversité des bactéries lactiques dans le lait de vache ainsi que dans le fromage type «Arzua » au lait cru fabriqué avec ce lait; sur un total de 348 isolats 302 ont été identifiés comme étant des bactéries lactiques dont 40% de lactocoques, 25% appartenaient au genre *Leuconostoc* et le reste était constitué de lactobacilles et d'entérocoques.

Badis *et al.*,( 2004)<sub>a</sub>, ont isolé à partir de 30 échantillons de lait de chèvre de l'institut technique de l'élevage bovin et ovin d'Alger, 158 souches de bactéries lactiques dont le genre *Lactobacillus* constituait 50,63%, *Lactococcus* 25,94%, *Streptococcus* 14,56%, *Leuconostoc* 7,59% et *Pediococcus* 1.26%. En identifiant les espèces, *Lc. lactis* constituait l'espèce dominante avec 32 souches suivie de *St. thermophilus* 23 souches, *Lb. bulgaricus* 19 souches, *Lb. helveticus* 16 souches et *Lb.*

*plantarum* avec 14 souches, dans une autre étude de Badis *et al.* (2004)b, 725 isolats de bactéries lactiques ont été prélevés à partir de lait de vache de 4 races différentes, dont la population bactérienne était dominée par des lactobacilles avec un pourcentage de 31,6% de *Lactobacillus*, suivi de *Lactococcus* 28,4%, puis de *Leuconostoc* 22,2%, et 13,7% de *Streptococcus* et 4,1% de *Pediococcus*.

Cheriguene *et al.* (2007), quant à eux, ont noté que les entérocoques dominaient la population bactérienne du lait de chèvre de l'ouest Algérien, avec un pourcentage de 41,82%, et où les lactocoques ne représentent que la 3<sup>ème</sup> population avec 19,60% après les lactobacilles (29,40%).

La biodiversité des populations bactériennes dans le lait dépend de plusieurs paramètres, de l'espèce animale, bovine ou caprine (Montel, 2004) de la région, des fourrages consommés et du climat (Badis *et al.*, 2004b) ainsi que des saisons. En effet Psoni *et al.* (2003), on rapporté que la composition de la microflore du lait était affectée par les saisons, et que les lactocoques étaient les plus abondants d'une manière générale, cependant en hiver les entérocoques dominant la microflore, alors qu'en été et au printemps c'est *Lactobacillus* qui domine.

## **I.2. Identification des souches isolées.**

L'identification est basée sur des critères biochimiques et physiologiques spécifiques, en utilisant une souche de *Lc. lactis* de référence comme standard et en se référant aux données de Kimoto *et al.* (2004) et Teuber et Geis, (2006) (annexe II).

L'identification des souches isolées a reposé dans un premiers temps sur des tests physiologiques permettant de s'orienter vers le genre recherché. Ces tests se basent essentiellement sur l'aptitude des souches à croître dans différentes conditions de pH, de température, de salinité. Les résultats de ces tests sont illustrés dans le tableau IX.

**Tableau IX : Résultats des tests d'identification physiologiques des lactocoques**

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	<i>Lc. lactis subsp lactis</i> référence	
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Production de CO<sub>2</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Croissance à : 10°C 40°C 45°C</b>	+ - -	- + +																												
<b>Croissance à pH 9,2 à pH 9,6</b>	+ -	- -	+ -	+ +	- -	- -	+ -	+ -	+ -	- -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ +	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ +	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
<b>[NaCl] 4% 6,5%</b>	+ -	+ +	+ -	- -	+ +	+ -	+ -	+ +	+ -	+ -	+ +	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -													
<b>Croissance sur lait bleu de Sherman</b>	A C R																													

- + : Réaction positive ; - : Réaction négative ; ACR : Acidification, Coagulation, Réduction

Les résultats des tests physiologiques ont permis de retenir les souches S1 à S14, et d'éliminer les souches S15 à S28 car ne correspondant pas aux mêmes caractères physiologiques de la souche *Lc. lactis* de référence.

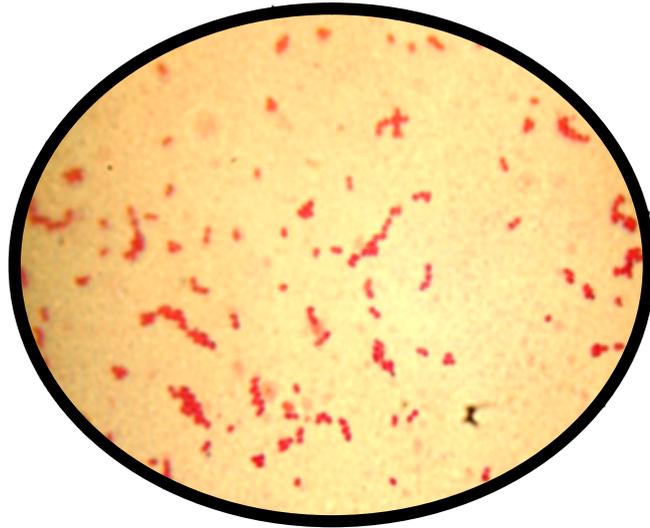
Des tests biochimiques ont été effectués sur les quatorze souches retenues pour confirmer leur appartenance à l'espèce *Lc. lactis*. (Tableau X.)

**Tableau X : Résultats des tests d'identification biochimiques des lactocoques**

Souches testées		Lc. S1	Lc. S2	Lc. S3	Lc. S4	Lc. S5	Lc.S6	Lc.S7	Lc.S8	Lc.S9	Lc .S10	Lc .S11	Lc .S12	Lc .S13	Lc.S14	Lc. lactis référence
Recherche de la catalase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type fermentaire		Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
Désamination de l'arginine		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation des	Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Salicine	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

• - : Réaction négative ; + : Réaction positive ; +/- réaction intermédiaire.

Les souches retenues sont formées de cellules ovoïdes, de coloration de Gram positif, regroupées en paires et/ou en chainettes de longueur variable (figure 18), sont catalase négative et ne produisent pas de CO<sub>2</sub> à partir du glucose. Les résultats des tests d'identification illustrés sur les tableaux IX et X permettent de confirmer l'appartenance de ces souches à l'espèce *Lactococcus lactis*.



**Figure 18** : Observation microscopique d'une des souches de *Lactococcus lactis* isolée après coloration de Gram.

Sur 59 souches isolées au départ, 14 (Lc1 à Lc14) ont été identifiées comme étant des souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et aucune souche de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* n'a été trouvée, ce qui est en accord avec les résultats d'autres études où *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* était plus fréquemment isolé que la sous espèce *cremoris* à partir d'échantillons de lait cru (Cheriguene *et al.*, 2007) à partir de fromage au lait cru (Lopez-Diaz *et al.*, 2000) d'échantillons de "Raib" fabriqué de façon artisanale au Maroc (Hamama, 1991)

Il est admis que la présence des lactocoques dans le lait cru revient à une contamination par les fourrages pendant la traite, les deux espèces de *Lactococcus* les plus communément isolées à partir du lait sont *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Casalta et Montel, 2008)

La différenciation entre les deux sous espèces *Lc. lactis* et *Lc. cremoris* se fait par quelques caractéristiques phénotypiques comme l'absence de croissance à 40°C, à une concentration de 4% et plus de NaCl et à un pH de 9,6 ainsi que l'incapacité d'hydrolyser l'arginine pour la sous espèce *cremoris*. (Teuber et Geis, 2006)

Nomura *et al.*, (2006) ont isolé et identifié génétiquement par le séquençage de l'ARN 16s des souches de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* qui présentaient deux phénotypes

différents les unes avec le phénotype de la sous espèce lactis et les autres avec le phénotype de la sous espèce cremoris.

## **II-Isolement et identification des souches de *Staphylococcus aureus***

Dans un premiers temps l'isolement de souches de *S. aureus* a été effectué à partir de lait de vache ou de chèvre mammitéuse et de lait de vache non mammitéuse, dans un second temps les souches identifiées comme appartenant à l'espèce *S. aureus* ont fait l'objet d'antibiogrammes pour la recherche d'éventuelles résistances aux antibiotiques.

### **II.1. Isolement**

L'isolement des souches de *S. aureus* a été effectué à partir de 3 vaches saines dont l'une avait déjà été atteinte de mammites sub clinique, de 4 vaches atteintes de mammites sub-cliniques pendant la période de leur traitement, de 6 vaches et 1 chèvre atteintes de mammité sub-clinique avant leur traitement, et d'une vache atteinte de mammité clinique 10 jours après la période de son traitement.

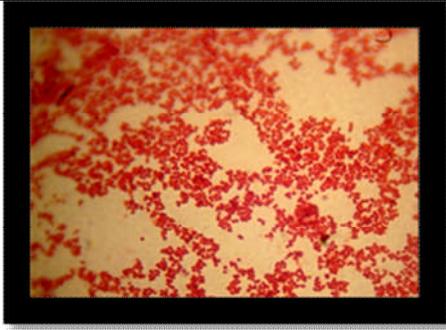
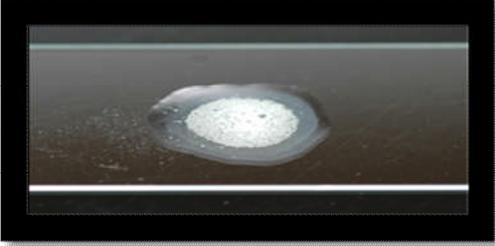
Les souches de staphylocoques isolées à partir des échantillons ayant donné une coloration noire dans Giolitti Cantoni, sont purifiées sur de la gélose Chapman. Les souches fermentant le mannitol et formant des colonies jaune-doré sur Chapman sont retenues pour l'identification.

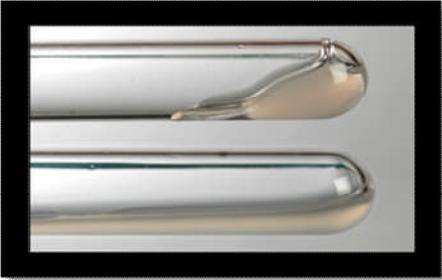
5 échantillons de lait de vaches mammitéuses et 1 échantillon de lait de chèvre mammitéuse ne contenaient pas de staphylocoques, on en a conclu que ces mammites étaient dues à des agents microbiens autres que des staphylocoques.

### **II.2. Identification des souches de *S. aureus***

11 souches de *Staphylococcus aureus* ont été purifiées et identifiées en se référant aux données de Guiraud et Rosec (2004). Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau XI.

**Tableau XI :** Résultats de l'identification des souches de *S. aureus*

Test effectué	Caractères recherchés	Résultats	Illustration
Culture sur milieu Chapman	Fermentation du mannitol	Colonies jaune doré entourées d'une auréole jaune (mannitol +)	
Culture sur milieu Baird Parker	- Réduction de tellurite de potassium. - Hydrolyse par une lécithinase des lécithines du jaune d'œuf.	-Colonies noires  -Halo clair autour de la colonie	
Coloration de Gram	Aspect des cellules et type de paroi	Coccies Gram positif disposées en amas.	
Test de catalase	Présence d'une catalase.	Apparition d'une effervescence.	

Test de l'ADNase	Présence d'une ADNase.	Après pulvérisation de HCl 1N sur la boîte de Petri, les colonies apparaissent entourées de zones claires	
Test de coagulase.	Présence d'une coagulase.	Coagulation du plasma.	

Les tests d'identification ont permis de confirmer l'appartenance des souches S1 à S11 à l'espèce *Staphylococcus aureus*

Les souches S12 à S15 isolées à partir de lait des vaches mammites avant la période du traitement, étaient des staphylocoques à coagulase négative et n'ont donc pas été retenus pour la suite du travail

Sur 19 échantillons de lait de vaches mammites, 26,31% de ces mammites n'étaient pas dues à des staphylocoques, 21,05% étaient dues à des staphylocoques à coagulase négative et 52,64% à *S. aureus* et sur 2 échantillons de lait de deux chèvres mammites l'une des mammites était due à un *S. aureus* et l'autre n'était pas due à un staphylocoque.

95% des cas de mammites sont des mammites subcliniques, dans les cas de mammites subcliniques, des changements macroscopiques des mamelles ne sont pas observés, il se produit des changements dans la composition et la quantité de lait produit (Fox *et al.*, 2001).

Les mammites peuvent être dues à différents agents microbiens comme *Streptococcus spp.*, Enterobacteries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacteria* et des champignons, cependant les espèces de *Staphylococcus* restent les agents causaux de mammites les plus fréquemment

diagnostiqués (Contréras *et al.*, 2007). Tapenen et pyorala, (2008) ont rapporté que les staphylocoques étaient les bactéries les plus fréquemment isolées des cas de mammites subcliniques et que les staphylocoques à coagulase négative avaient la même incidence que *Staphylococcus aureus*, comme agent des mammites.

White *et al.* (1999) ont étudié la prévalence des mammites cliniques et subcliniques sur 2911 quartiers de mamelles de chèvres durant une période de 7ans, ils ont rapporté que les staphylocoques à coagulase négative constituaient l'agent de mammites le plus fréquemment isolé, avec une fréquence de 38,2% suivi de *S. aureus* avec 11% des cas ensuite de Streptocoques avec 4,1% des cas.

Cependant les infections mammaires causées par *S. aureus* attirent une attention particulière car en plus de causer des mammites subcliniques *S. aureus* peut provoquer des cas de mammites cliniques très sévères et gangréneuse qui peuvent mener à l'abattage de l'animal (Gruet *et al.*, 2001; Contreras *et al.*, 2007). En effet le cas de mammite clinique rencontré dans cette étude a mené à l'abattage de la vache mammiteuse.

En plus de l'implication des mammites dans les pertes financières, il ne faut pas négliger leur importance en santé publique. L'utilisation intensive des antibiotiques pour le traitement et la prévention des mammites constitue une possible menace pour la santé humaine par l'émergence des souches antibio-résistantes qui, par le biais du lait est introduit dans la chaîne alimentaire. (Bradley, 2002)

### II.3. Standardisation des *inocula*

Afin de pouvoir effectuer les antibiogrammes des souches de *S. aureus* ainsi que les tests d'antagonisme, les *inocula* de celles-ci ont été standardisés.

Après les dénombrements effectués pour les souches et *S. aureus*, le nombre de cellules viables par ml de culture pour chaque souche est illustré sur le tableau XII :

**Tableau XII** : Résultats du dénombrement des souches de *S. aureus*.

Souches de <i>S. aureus</i> .	S1	S 2	S 3	S4	S5	S6	S7	S8	S8	S9	S10	S11
Nombre de cellules / ml	1,5. 10 <sup>8</sup>	7. 10 <sup>8</sup>	5. 10 <sup>8</sup>	8. 10 <sup>8</sup>	7. 10 <sup>8</sup>	4,2. 10 <sup>8</sup>	2. 10 <sup>8</sup>	9. 10 <sup>7</sup>	4. 10 <sup>7</sup>	3. 10 <sup>7</sup>	4. 10 <sup>8</sup>	2,3. 10 <sup>7</sup>

Pour obtenir les taux d'*inocula* nécessaires aux études ultérieures, des dilutions ont été réalisées, à  $10^7$  cellules/ml pour les antibiogrammes et à  $10^5$  cellules/ml pour les tests d'antagonisme

### III. Antibiogramme des souches de *S. aureus* isolées et identifiées

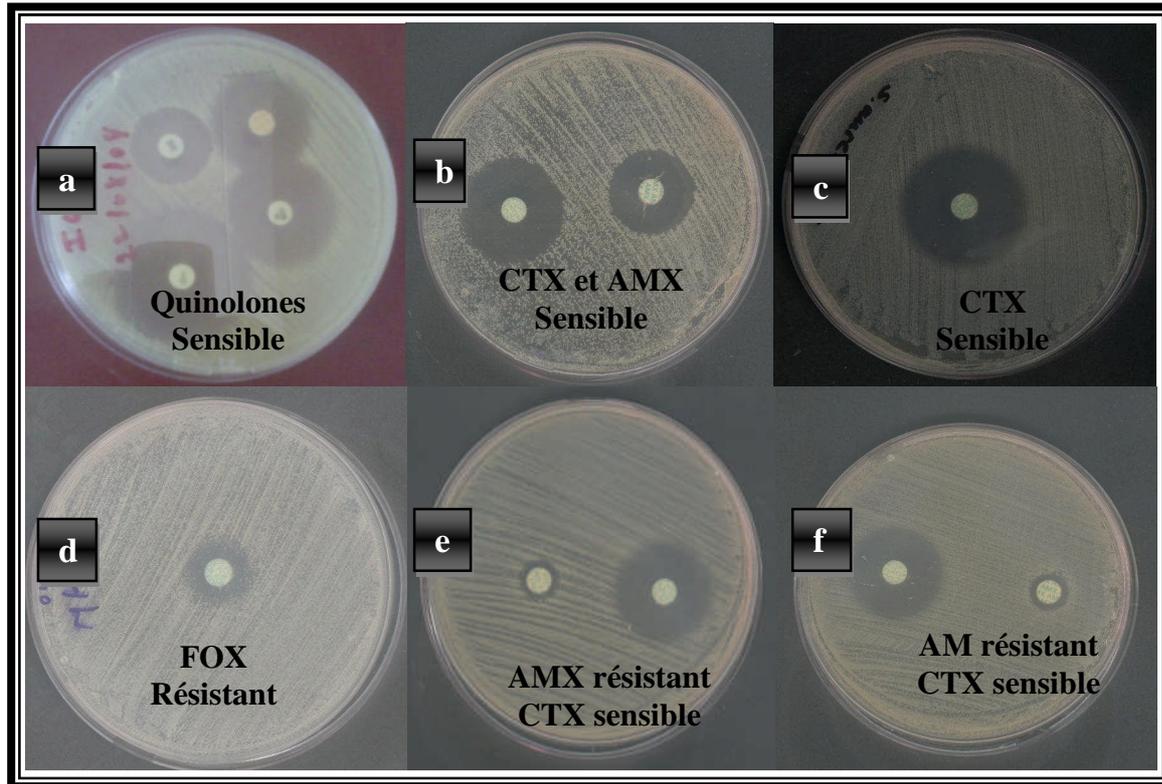
Les résultats des antibiogrammes des souches de *Staphylococcus aureus* sont représentés dans le tableau XIII.

**Tableau XIII : Résultats des antibiogrammes des souches de *S. aureus* isolées.**

	Vaches saines			Vaches ou chèvre mammitieuse non traitées			Vaches mammitieuses pendant traitement				Vache mammitieuse après traitement
	S8	S9	S10	S11	S4	S1	S2	S3	S5	S6	S7
FOX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PEF	S	S	S	S	S	S	S	S	/	S	S
AN	S	S	S	R	S	/		S	S	S	S
CTX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
GM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
AMX	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
AM	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CN	S	S	S	S	S	R	/	R	/	R	R

S : sensible  
R : résistant

Les souches présentant des diamètres intermédiaires sont considérées comme sensibles. (Tableau IV, annexe II)



**Figure19 :** AntibioGrammes des souches de *S. aureus* ; **a** et **d** : *S. aureus* S7; **b** : *S. aureus* S1, **c** : *S. aureus* 11 ; **e** : *S. aureus* S6 ; **f** : *S. aureus* S4.

Deux des souches de *S. aureus* isolées de vaches saines la S9 et la S10 présentent des résistances à l’ampicilline et à l’amoxicilline, quant à la souche S8 elle ne présente de résistance à aucun des antibiotiques testés.

Les souches isolées de la chèvre et des vaches mammites avant leur traitement et des vaches mammites en cours de traitement, présentent toutes une résistance à l’ampicilline qui est un antibiotique largement utilisé. On note également des résistances à l’amoxicilline et à la cephalexine.

Toutes les souches de *S. aureus* isolées sont sensibles à la céfoxitine à l’exception de la souche *S. aureus* S7 qui y est résistante et qui est par la même résistante à la méthicilline et à toutes les bêtalactamines.

Dans une étude rapportée par Nickerson (2008), 45 quartiers de mamelles de chèvres traitées aux antibiotiques, contenaient *Staphylococcus aureus* pendant leur traitement. Il a rapporté que même avec un traitement et une voie d’administration optimale, seulement 90,9% des infections intra-mammaires disparaissaient complètement pour les chèvres et chez les vaches le taux était inférieur, il reste donc

toujours une large proportion de bactéries non éliminée, cette persistance peut être due à la sélection de souches résistantes aux antibiotiques, elle peut également être due à la non accessibilité des antibiotiques à la zone d'infection en quantité efficace (Gruet *et al.*, 2001), ou encore à la formation de biofilms par les souches de *S. aureus* de mammites, ce qui les rend moins sensibles aux antibiotiques (Melchior *et al.*, 2009)

Les bêta-lactamines sont très largement utilisées pour le traitement des mammites bovines et caprines, ce qui a naturellement conduit à l'apparition de résistance chez les souches de *S. aureus* responsables des mammites. La production de bêta-lactamases est très courante chez les souches de *S. aureus* d'origine humaine tandis que la recherche de leur production chez les souches d'origine vétérinaire n'est pas courante (André *et al.*, 2008). Dans l'étude de Kaszanyitzky-Juhasz (2003), 96% et 55% de souches de *S. aureus* isolées de patients humains et de mammites respectivement étaient bêta-lactamase positive, (Peles *et al.*, 2003). Les bêta-lactamases de *S. aureus* sont inductibles et leur production est accrue en présence de pénicillines, elles inactivent les pénicillines G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. Elles sont inactives sur les autres bêta-lactamines et en particulier sur les pénicillines M, elles sont sensibles aux inhibiteurs de bêta-lactamases, l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique (Augmentin) retrouve son activité sur les staphylocoques résistants par production de bêta-lactamases. (Fuda *et al.*, 2005)

Les résultats obtenus indiquent que sur 11 souches de *S. aureus* isolées, 99.9% sont résistantes à l'ampicilline, 72% présentent une résistance à l'amoxicilline et à la cephalexine et 9% présentent une résistance à la cefotaxime, la gentamicine et à la cefoxitine, aucune résistance n'a été détectée pour la pefloxacin qui fait partie de la famille des quinolones, ni à l'amikacine qui est un aminoside. Ces résultats montrent que les souches isolées ont développé des résistances aux bêta-lactamines mais pas pour les quinolones ni les aminosides, ce qui est en accord avec les observations faites par d'André *et al.* (2008) qui ont trouvé que 70,8% des souches de *S. aureus* isolées de lait cru d'une ferme laitière en Espagne, présentaient une résistance à la pénicilline, Même observation avec Getahun *et al.* (2008) qui ont isolé 85 souches de *S. aureus* de

mammites cliniques et sub cliniques dont 53,4 % étaient résistantes à l'ampicilline et 43,31% à la pénicilline, Ben Hassen *et al.*(2003) ont isolé 108 souches de *S. aureus* à partir de lait de vaches atteintes ou non de mammite de 3 exploitations laitières intensive différentes en Tunisie, parmi lesquelles 64% des souches de *S. aureus* présentaient une résistance à la pénicilline G et aucune résistance n'a été observée pour les aminosides, pour les rifamycines, et les quinolones ainsi que l'association sulfamides-triméthoprimine et l'acide fusidique, Barboza-Coreona *et al.* (2009) ont analysé pendant 5 mois 26 vaches maintenues en troupeau dans une ferme dans une province du Mexique, 50 souches de *S. aureus* ont été isolées à partir de ces vaches mammites pour lesquelles la sensibilité aux antibiotiques a été testée. Toutes les souches isolées présentaient une résistance à au moins deux des antibiotiques testés, 92% et 74% des souches étaient résistantes à la pénicilline et à l'amoxicilline par contre la résistance aux antibiotiques des autres classes était assez faible. L'évaluation des résistances aux antibiotiques des agents des mammites constitue donc un outil important pour le contrôle des mammites et devrait être effectué dans toutes les exploitations laitières.

La résistance à la méthicilline des souches de *S. aureus* est due principalement à deux facteurs la synthèse de Bêtalactamases ou à la présence du gène *mecA* qui code pour une protéine de liaison aux pénicillines: (PBP) 2a de faible affinité aux bêtalactamines conférant ainsi une résistance à toutes les bêtalactamines. (Fuda *et al.* 2005)

Normanno *et al.* (2007)b ont isolé 160 souches de *S. aureus* à partir de nourriture d'origine animale (lait et produits laitiers, viandes et produits carnés) pour lesquelles ils ont recherché l'entérotoxinogénicité et l'antibiorésistance, ils ont constaté que toutes les souches étaient entérotoxinogènes et résistantes à au moins deux des antibiotiques testés, et que 3,75% des souches possédaient le gène *Mec A* et donc étaient résistantes à la méthicilline.

Les infections à *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez les animaux est surprenant donnant un rôle considérable à *S. aureus* comme agent pathogène pour les bovins et les humains en contact étroit avec les troupeaux laitiers, et depuis le premier constat de souches SARM responsables de mammites du bétail (Devriese *et*

*al.*, 1972), de nombreux cas de SARM responsable de mammites chez les troupeaux laitiers ont été rapportés (Kwon *et al.*, 2005; Juhasz-Kaszanyitzky *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2007)

Reinoso *et al.* (2008) ont rapporté dans une étude basée sur la caractérisation génotypique de souches de *S. aureus* isolées d'origines différentes : l'Homme, les mammites bovines et les aliments d'origine animale, que les résistances provenant de mammites sub-cliniques pouvaient éventuellement constituer une zoonose et donc une menace pour l'être humain.

Les souches SARM retrouvées dans le lait cru présentent un danger pour les consommateurs de lait cru et de ses produits dérivés. Normanno *et al.* (2007) ont étudié les résistances aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées de viandes et de laits crus et dérivés, ils ont conclu que la présence de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques dans les produits alimentaires d'origine animale était très répandue.

Weese et van Duijkeren (2009), en s'appuyant sur des études ayant identifié 0,2 à 0,5 % de souches SARM présentes dans du lait cru et dans deux sortes de fromages, confirment que la présence de souches SARM dans les produits alimentaires ont une incidence directe sur la santé humaine.

**VI. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches de *Lactococcus lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* résistant aux antibiotiques**

**IV. 1. Standardisation des *inocula***

Afin de pouvoir comparer l'aptitude des différentes souches de *Lc. lactis* isolées, à produire des substances antibactériennes, une standardisation des conditions de culture a été effectuée, les *inocula* des souches ont été standardisés à  $10^8$  cellules/ml

**Tableau XIV : Dénombrement des souches de *Lc. lactis*.**

Souches de <i>Lc. lactis</i>	Lc1	Lc2	Lc3	Lc7	Lc9	Lc 10	Lc 11	Lc 12	Lc 13
Nombre de cellules / ml	$2.10^8$	$4.10^8$	$2.10^9$	$2.10^8$	$3.10^9$	$3.10^8$	$2.10^8$	$4.10^9$	$3.10^8$

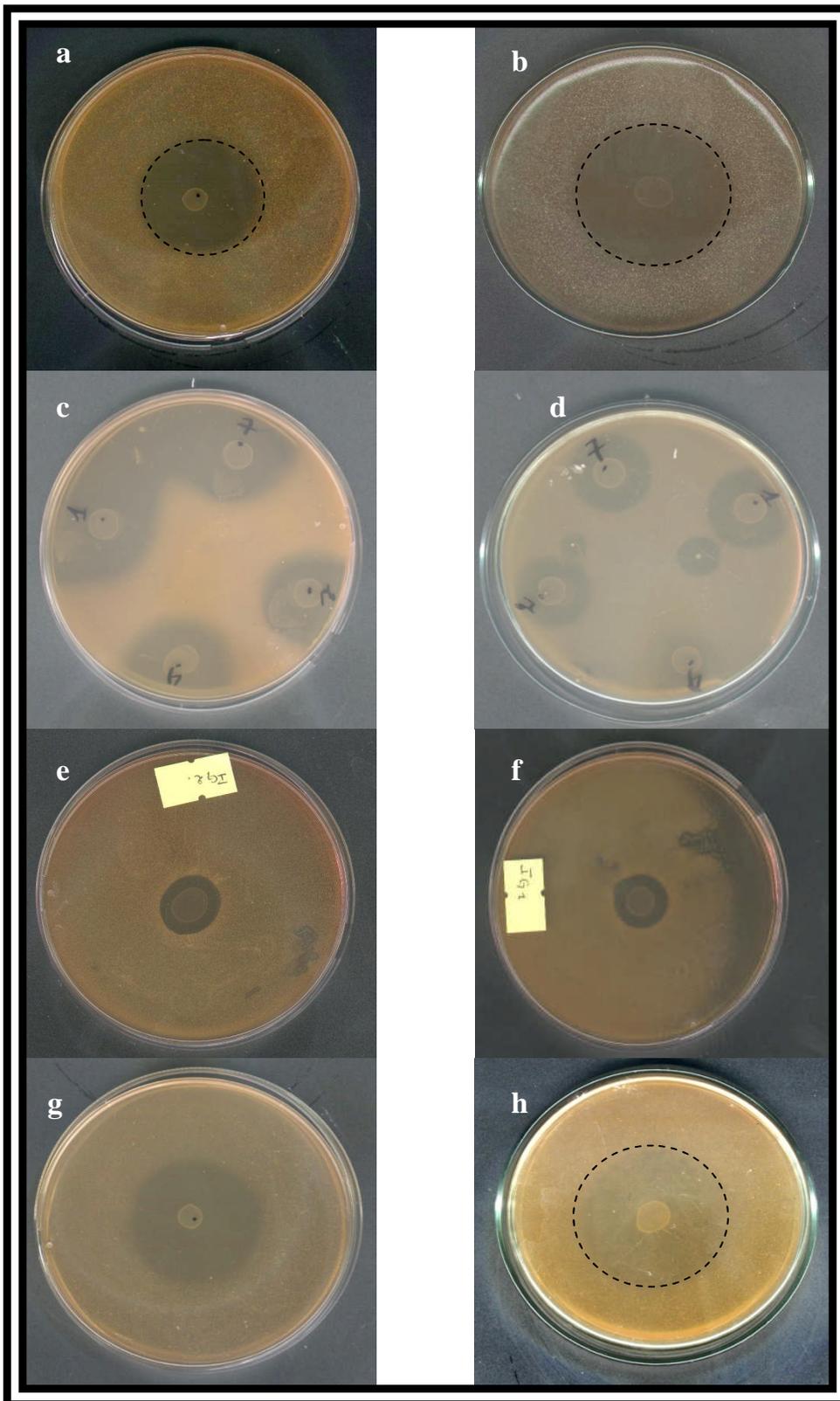
Pour obtenir les taux d'*inocula* nécessaires pour les tests des "spots" et des puits, des dilutions ont été réalisées.

**IV.2. Test des Spots**

Dans des tests préliminaires d'activité antibactérienne, les souches *Lc. lactis* Lc4, Lc5, Lc6 et Lc14 n'ayant montré que peu ou pas d'inhibition à l'égard de *S. aureus*, n'ont donc pas été retenues pour la suite du travail.

Les souches de *S. aureus* utilisées pour le test des "spots" sont les souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S11, isolées de mammites ainsi que deux souches résistantes à la méthicilline *S. aureus* A et *S. aureus* B faisant partie de la collection de du laboratoire du LMA.

Le test des spots a révélé de bonnes activités antibactériennes des souches de *Lc. lactis* : Lc1, Lc2, Lc3, Lc7, Lc8, Lc9, Lc10, Lc11, Lc12 et Lc13 à l'égard des souches de *S. aureus*. Les figures suivantes illustrent les résultats du test des spots.



**Figure 20 :** Zones d'inhibition des test des spots, **a :** *Lc. lactis* Lc1 à l'égard de *S. aureus* A, **b :** *Lc. lactis* Lc1 à l'égard de *S. aureus* S7, **c, d :** *Lc. lactis* Lc1, Lc2, Lc4 et S7 à l'égard de *S. aureus* B et *S. aureus* S6 respectivement, **e :** *Lc. lactis* S10 à l'égard de *S. aureus* S6, **f :** *Lc. lactis* Lc3 à l'égard de *S. aureus* Lc5, **g :** *Lc. lactis* Lc1 à l'égard de *S. aureus* Lc3, **h :** *Lc. lactis* Lc1 à l'égard de *S. aureus* Lc11.

L'activité antibactérienne illustrée dans la figure 20 représentée par l'apparition de zones d'inhibition indique que les souches de *Lc. lactis* pourraient synthétiser des substances antibactériennes à l'égard de *S. aureus*.

Les zones d'inhibition diffèrent entre les souches tests et pour la même souche test d'une souche cible à une autre. Les souches de *Lc. lactis* Lc1, Lc2 Lc7 et Lc9 ont témoigné d'une meilleure activité antibactérienne à l'égard des différentes souches de *S. aureus* par rapport aux autres souches test.

La souche Lc1 et la souche Lc7 de *Lc. lactis* ont montré une très bonne activité vis-à-vis des souches résistantes à la méthicilline *S. aureus* A, *S. aureus* B et *S. aureus* S7. Les diamètres d'inhibition sont présentés sur la figure 21.

Des résultats présentés sur la figure 21, on constate une nette différence dans le diamètre des zones d'inhibition en fonction des souches testées, indiquant un effet inhibiteur différent exercé par ces dernières à l'égard des différentes souches de *S. aureus*, Rosland *et al.* (2003) en criblant l'activité antibactérienne des souches de *Lc. lactis* envers *Bacillus cereus* ont également trouvé qu'il existait une variabilité intra-espèce entre les souches de *Lc. lactis* en ce qui concerne leur pouvoir inhibiteur.

La souche *Lc. lactis* Lc1 présente des diamètres d'inhibitions variant de 13mm à 31mm (Tableau I, annexe III) à l'égard des souches de *S. aureus* S5 et S7 respectivement, la souche *Lc. lactis* Lc7 présente également de grandes variations dans son pouvoir d'inhibition des souches de *S. aureus* avec des diamètres allant de 15mm à 31mm pour les souches S5 et S7. Ce qui indique que l'activité antibactérienne exprimée par ces souches soit aussi efficace à l'égard des souches de *S. aureus* isolées de mammites présentant une résistance à la méthicilline ou non qu'à l'égard des souches résistantes à la méthicilline d'origine hospitalière

On suppose que cet antagonisme est dû à la production de substances ou de métabolites qui ont un effet anti-staphylococcique. Ces métabolites peuvent être des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, ou encore des composés protéiques assimilables aux bactériocines. Les bactéries lactiques produisent une variété de métabolites capables d'interférer avec la croissance d'autres microorganismes (Vandenbergh, 1993)

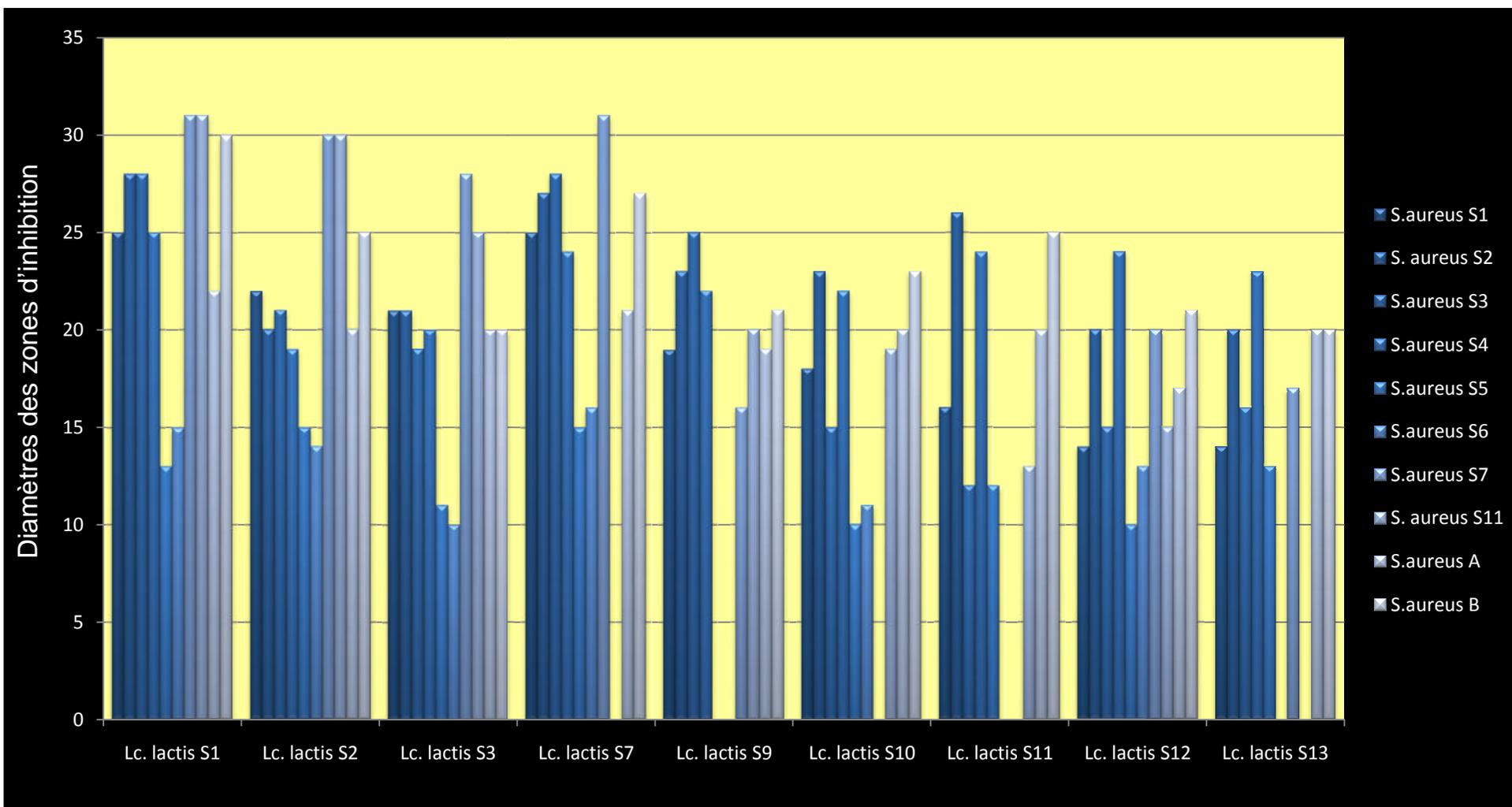


Figure 21 : diamètres des zones d'inhibition des souches de *Lc. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* isolées de mammites.

Rosland *et al.* (2003) ont attribué l'inhibition de *Bacillus cereus* dans le lait écrémé par *Lc. lactis* uniquement à la production d'acides organiques et à la diminution du pH. En effet l'action des acides organiques se traduit de trois manières différentes, par l'effet du pH bas qu'ils engendrent, l'effet de leur forme indissociée et de la nature de l'acide produit (Lindgren et Dobrogosz, 1990)

Dans cette étude, le pH atteint dans la zone des spots variait entre 5,9 et 6,03 or *S. aureus* croit à des pH allant de 4,2 à 9,3 (Elliot *et al.*, 2001), on en déduit qu'un pH de 6 n'est pas assez bas pour inhiber la croissance de *S. aureus*, l'apparition des zones d'inhibitions pourrait alors être due à des métabolites autres que les acides organiques. À l'inverse Rosland *et al.* (2005) ont trouvé que l'inhibition de *Bacillus cereus* par les souches de *Lc. lactis* testées était due à des substances non protéiques, ils ont admis que cette inhibition était due à la production d'acides organiques et que la production d'éthanol, de dioxyde de carbone et de peroxyde d'hydrogène contribuaient à cette inhibition.

L'antagonisme envers *S. aureus* par la production de peroxyde d'hydrogène est bien étudié pour les souches de *Lactobacillus*, dont certaines sont capables de provoquer un effet bactériostatique sur les souches de *S. aureus* (bien que catalase positive) avec une concentration de 0,18 mmol/L et un effet bactéricide avec une concentration allant de 0,6 à 1 mmol/L (Charlier *et al.*, 2008a). Haines et Harmon, (1973) ont rapporté que l'addition de catalase à un milieu où ont été cultivées des souches de *Lc. lactis* stoppait partiellement l'inhibition de *S. aureus*, les auteurs ont conclu que le peroxyde d'hydrogène conférait à ces souches la capacité d'inhiber *S. aureus*. Ito *et al.* (2003) ont étudié le potentiel de *Lc. lactis* à inhiber les germes pathogènes et d'altération par la production de peroxyde d'hydrogène, ils ont montré qu'une quantité de 350ppm de peroxyde d'hydrogène produite par des souches de *Lc. lactis* avait une action antimicrobienne efficace à l'égard de *S. aureus*, cependant lorsqu'ils ont étudié le filtrat cellulaire des souches les plus productrices de peroxyde d'hydrogène, ils ont constaté qu'un faible effet inhibiteur à l'égard de *S. aureus*. Charlier *et al.* (2008a) affirment qu'actuellement le rôle du peroxyde d'hydrogène

dans l'inhibition de *S. aureus* par les bactéries lactiques reste difficile à démontrer et est donc toujours controversé.

Le potentiel antagoniste des bactéries lactiques envers *S. aureus* peut également faire intervenir la production de bactériocines (Cotter *et al.* 2005). *Lactococcus lactis* est connu pour produire diverses bactériocines (Stoyanova *et al.* 2007) depuis la découverte de la nisine par Rogers et Whittier en 1928, bactériocine produite par des souches de *Lc. lactis*. (Juncioni de Arauz *et al.*, 2009). Diverses études ont prouvé le potentiel des différentes souches de *Lc. lactis* à inhiber les microorganismes pathogènes par la production de bactériocines (McAuliffe *et al.*, 1999; Hamama *et al.*, 2002; Ghrairi *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006)

Néanmoins, quelque soit l'origine de l'antagonisme provoqué par les souches de *Lc. lactis*, son efficacité représente un potentiel important pour la lutte contre les souches de *S. aureus* particulièrement les souches SARM, actuellement d'intensives recherches sont consacré au développement d'alternatives aux antibiotiques (Barboza-Corona, 2009) l'une de ces alternatives serait l'utilisation de bactériocine produites par les bactéries lactiques, ou encore d'utiliser les bactéries lactiques en elles-mêmes du fait de l'efficacité de leur antagonisme et de leur statut de GRAS.(Galvin *et al.*, 1999)

### IV.3. Recherche de l'activité antibactérienne du surnageant de culture de *Lc.*

#### *Lactis* :

Les surnageants de culture de 18h des souches de *Lc. lactis* correspondant à un taux de  $10^8$  cellules /ml est testé à pH natif c'est-à-dire (5,7 à 6,2) et à pH neutralisé, le test des puits n'a montré aucune zone d'inhibition.



**Figure 22 : Test des puits :**

Un effet de dilution a été supposé; pour y remédier, une concentration 5 fois sous vide du surnageant a été effectuée, le concentré obtenu a été testé pour son activité,

Dans tous les cas, il n'y a pas eu apparition de zone d'inhibition pour aucune des souches de *Lc. lactis* à l'égard de toutes les souches de *S. aureus*

L'activité anti-staphylococcique des souches de *Lc. lactis* n'a donc pas pu être mise en évidence dans les surnageants, bien que celle ci soit très claire dans le test des spots.

La présence d'une substance antibactérienne liée à la paroi bactérienne serait possible. Dans le but de re-larguer cette éventuelle substance attachée à la paroi, la culture de *Lc. lactis* a été traitée dans des conditions favorisant la désorption, puis le surnageant obtenu est testé pour son activité inhibitrice à l'égard de *S. aureus*.

Les bactéries lactiques ont un fort potentiel à fixer de grandes quantités de peptides cationiques et hydrophobes telles que les bactériocines, probablement sur les acides teichoïques et lipoteichoïques de la paroi, chargés négativement (Holo et al., 2002)

D'après les résultats il apparaît clairement que l'absence de zone d'inhibition en milieux liquides n'est pas due à l'adsorption d'éventuelles bactériocines sur la paroi, puisqu'aucune zone n'est apparue avec la solution de désorption.

Nielsen *et al.* (2003) ont rapporté que la production de bactériocines ne peut être détectée qu'en milieux solide pour de nombreuses souches productrices. En effet Holo *et al.* (2002) ont noté que la production de bactériocines par les bactéries lactiques en milieux liquides est difficile à démontrer du fait de leur faible production dans ces milieux ainsi, Lyon et Glatz (1990, 1993) ont trouvé que la production de propionicine PLG1 était si faible en bouillon que son activité n'a pu être détectée que dans des échantillons de surnageant concentré. Cependant il a également été rapporté par Leal *et al.* (1998) qu'aucune activité de *Lb. Plantarum* LPO10 n'a été détectée ni dans le surnageant de culture, ni dans les précipités au sulfate d'ammonium, ni dans les échantillons concentrés 40 fois, mais elle a été détectée après passage des échantillons concentrés à travers des colonnes de chromatographie à interactions hydrophobes.

La production et l'expression de molécules antibactériennes par les bactéries lactiques peuvent varier selon différents facteurs Tadorov et Dicks (2004) ont rapporté qu'en variant le pH, la concentration des différents nutriments dans le milieu, et la température d'incubation, une production maximale de bactériocine pouvait être atteinte. Jones *et al.* (2008) ont trouvé que l'activité antimicrobienne de différentes bactéries lactiques était détectable par le stab-agar test mais cette activité n'était pas détectable par le test de diffusion en puits. Ils ont attribué cela au fait que la production et la libération de molécules antimicrobiennes par les bactéries lactiques dépendait de différents facteurs et conditions de culture dont les variations peuvent rendre la détection de ces molécules difficiles par des tests de diffusion. De tels résultats renforcent l'idée que le comportement des bactéries lactiques sur les milieux de culture n'est pas nécessairement reproductible dans les aliments.

Des tests seront réalisés dans ce sens par le suivi de *S. aureus* en culture mixte avec *Lc. lactis* dans le lait et le fromage.

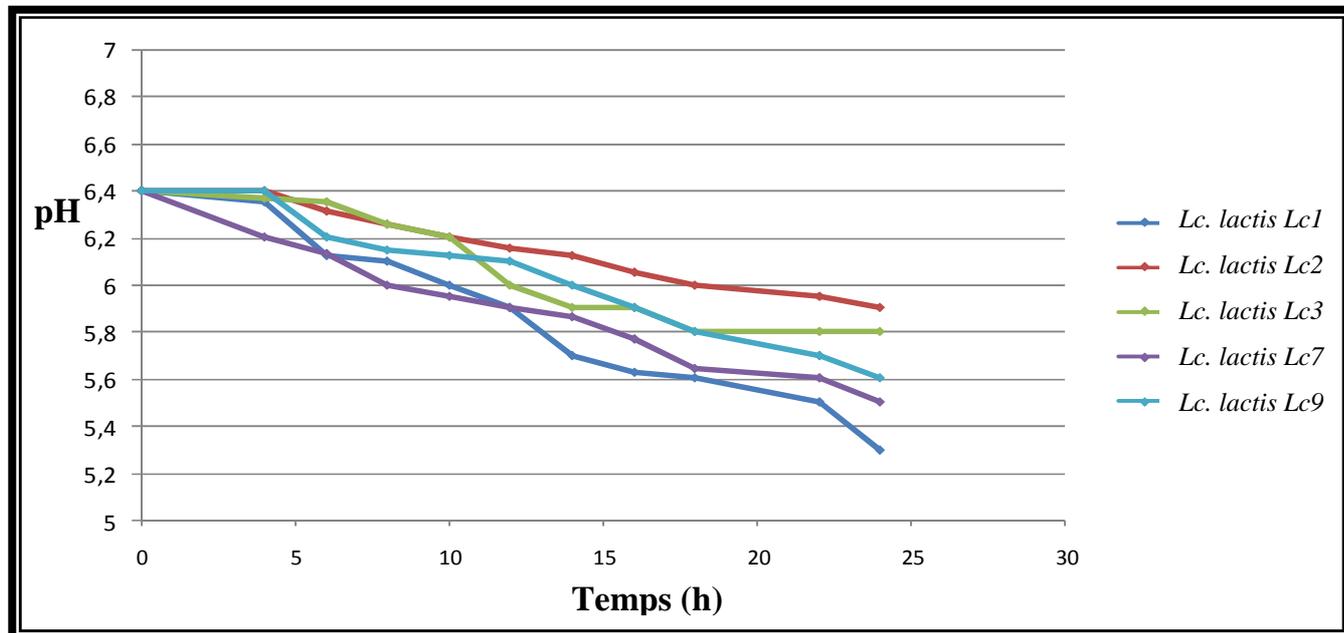
## V. Activité acidifiante de *Lc. lactis*

Les souches de *Lc. lactis* Lc1, Lc2, Lc3, Lc7 et Lc9 ayant donné de meilleures croissances et activités antibactériennes ont été retenues pour la suite de l'étude. Elles ont fait l'objet du suivi de leur activité acidifiante.

Le rôle principal des bactéries lactiques est de produire de l'acide lactique à partir des sucres. Selon les espèces et les souches, la vitesse d'acidification et/ou la production d'acide lactique varient considérablement. L'activité acidifiante (évolution du pH et production d'acide lactique) des souches de *Lc. lactis* isolées est évaluée à 30°C dans du lait écrémé.

### V.1. Évolution du pH

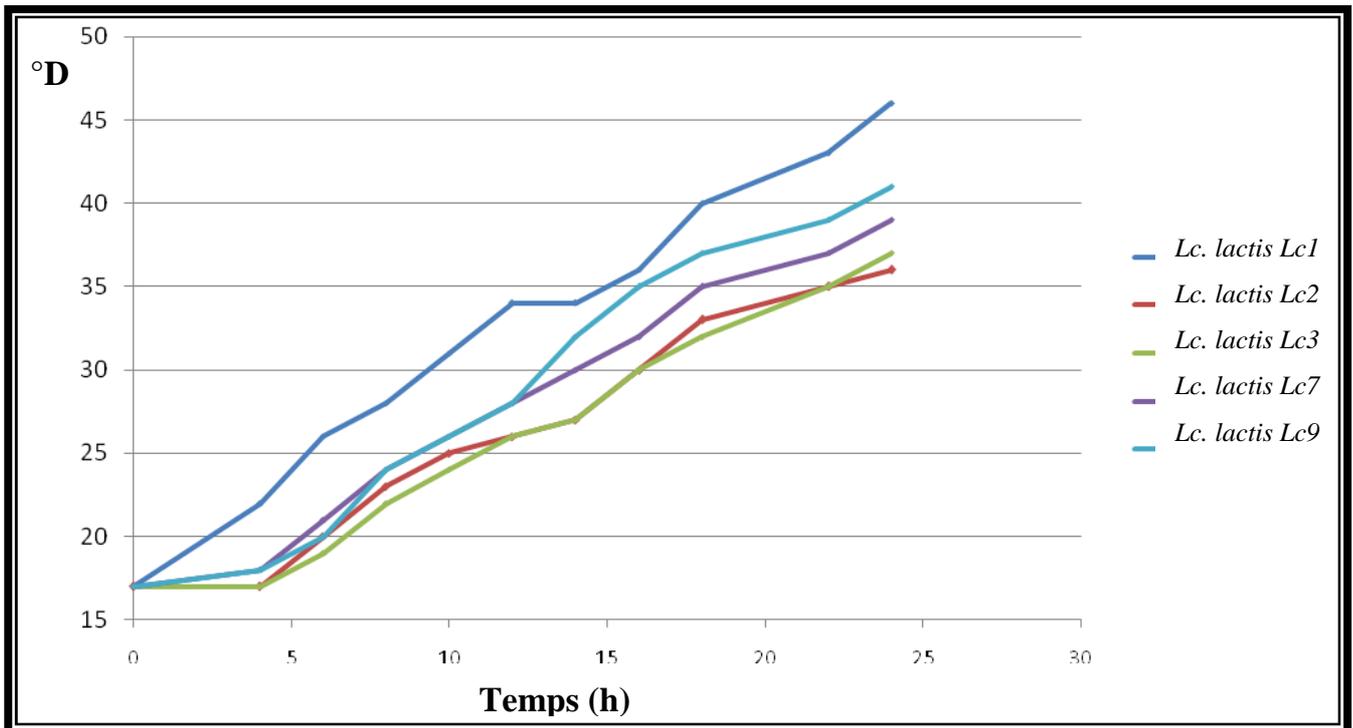
Le pH initial du lait est d'environ 6,40. La figure 23 montre que durant les 24h d'incubation, la diminution du pH du laitensemencé avec les souches de *Lc. lactis* suit la même allure pour toutes les souches, en outre cette diminution est assez lente et peu poussée.



**Figure 23** Evolution du pH du lait ensemencé avec les souches de *Lc. lactis* (en fonction du temps)

## V.2. Évolution de l'acidité titrable

Les résultats de la mesure de l'acidité Dornic sont représentés dans la figure 24 :



**Figure 24 :** Evolution de l'acidité Dornic du lait ensemencé avec les souches de *Lc. lactis* (en fonction du temps)

Après 24 heures d'incubation dans du lait écrémé, aucun pH des souches de *Lc. lactis* n'est observé en dessous de 5, les souches ayant donné une plus forte acidification sont les souches Lc1 et Lc7 avec respectivement des pH de 5,3 et 5,5 et des acidités titrables de 46 et 41°D.

Certains auteurs ont classé les souches de *Lc. lactis* selon leur aptitude à produire de l'acide lactique, Martinez-Moreno (1976) ; Nunez et Medina (1980; Jeanson *et al.*, 2003) ; Mas et Gonzalez-crespo (1992) déterminent la différence entre une souche rapide et une souche lente du point de vue production en acide lactique par l'acidité titrable après 6h d'incubation, celle-ci est supérieure à 30°D pour les souches rapides. Cogan *et al.*(1997), ont proposé de classer les souches de *Lactococcus* comme des souches à acidification rapide, si celles-ci réduisent le pH du lait écrémé en dessous de 5,3 après 6h d'incubation à 30°C.

Les souches de *Lc. lactis* isolées dans cette étude font donc partie de la catégorie de souches à acidification lente. En effet Cogan *et al.* (1997) en criblant 1582 souches de lactocoques pour leur pouvoir acidifiant, ont trouvé que seulement 8,3% d'entre elles étaient capables d'acidifier le lait à un pH inférieur à 5,3 après 6 heures d'incubation. Centeno *et al.* (1996) ont également rapporté que les souches de lactocoques à acidification lente étaient plus répandues que les souches à acidification rapide, sur 121 souches de *Lactococcus* isolées de lait cru destiné à la fabrication du fromage 'Arzua' 103 étaient des souches à acidification lente, seulement 18 souches étaient capables de réduire le pH du lait écrémé à moins de 6 avec des valeurs minimales de 5,05) après 6h d'incubation à 30°C. Alonso-Calleja *et al.* (2002) en isolant et caractérisant 45 souches de *Lc. lactis* à partir de lait de chèvre et de fromage fabriqué avec ce même lait, ont trouvé que 55,55% des souches isolées étaient des souches à acidification lente, ces souches avaient besoin de 24 à 36 heures d'incubation pour former un coagulum, ils ont noté qu'il existait des différences significatives entre les cinétiques d'acidifications entre deux groupes de souches. Gratepenche *et al.* (2007) en étudiant la fermentation du lait par une culture mixte de souches acidifiantes, productrices de nisine, a trouvé que les souches *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 productrice de nisine Z était très faiblement acidifiante, ils ont attribué cette faible capacité d'acidification à la quantité insuffisante d'acide aminés libres dans le lait, et que les souches productrices de nisine perdaient leur activité protéinase, probablement à cause de la perte de plasmide codant pour les protéinases ou encore à l'incompatibilité entre l'expression de ces plasmides et la production de nisine. Rilla *et al.* (2003) ont remarqué que la production d'acide par une culture de starter pour fromage, était plus faible en présence d'une souche productrice de nisine Z, Rodriguez *et al.* (1998) ont rapporté que les souches de *Lc. lactis* productrices de nisine étaient généralement peu acidifiantes.

## VI. Culture mixte dans du lait écrémé stérile de *Lc. lactis* et *S. aureus*:

La souche *Lc. lactis* Lc1 ayant donné la meilleure activité acidifiante et un meilleur effet inhibiteur vis-à-vis des souches de *S. aureus* et la souche de *S. aureus* S7 résistante à la céfoxitine et par la même à toutes les bêtalactamines ont été retenues pour la suite du travail afin de mettre en évidence l'effet antagoniste de *Lactococcus lactis* Lc1 à l'égard des souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques en culture mixte dans le lait écrémé et dans le fromage. A cet effet, avant d'entamer la suite de l'étude, il était important de confirmer l'appartenance de la souche Lc1 à l'espèce *Lactococcus lactis*

*Lactococcus lactis* Lc1 a donc été identifié génotypiquement par PCR amplifiant le gène spécifique de l'ARNr 16S.

L'ADN génomique de l'isolat est amplifié par deux couples d'amorces : F515/R930 et F915/R1406 spécifiques à l'espèce *Lactococcus lactis*. L'ADN de l'isolat s'est hybridé aux paires d'amorces utilisées et le produit de la PCR est séquencé. La séquence obtenue :

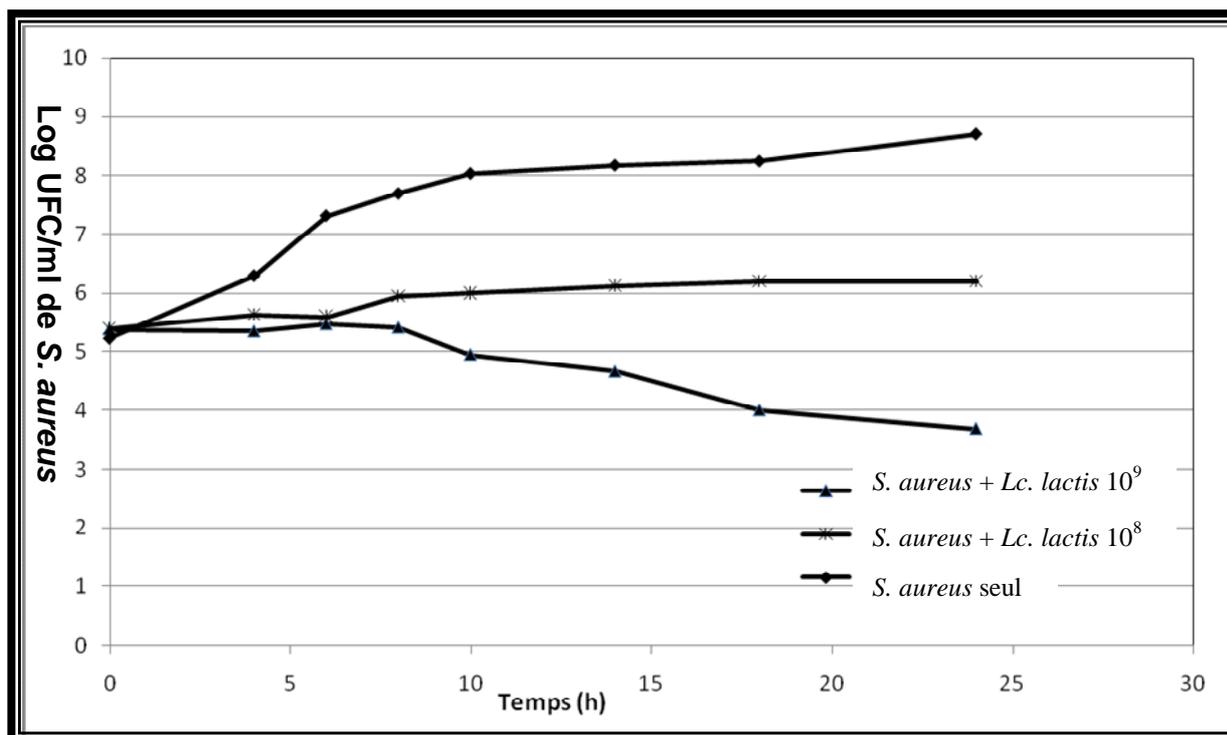
```
TTGGTTCGTCTCGGGCGTGTCGGATTATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGTG
GTTTATTAAGTCTGGTGTAAGAGGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTG
GAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCT
CTGGCCTGTAAGTACTGACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTAGGGA
GCTATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCAATAGTT
CGCCGTCCCTTTCCGGGAGGAACCGGGACTCGCTGCTCTTCCCCTCTCC
GCGCGTTCTTCTCTACCCCCGAGTTTTACGATGCGGAGAACCTTCTTCACT
CCCGCGGGGGCTAGCACAAGAACCTAATTCTGCTCCCTAGGAATTTTTAA
GTTTAAGGCCAAGATCGGGTCCTTGCCTGGTGTGCCCGCGCCCTAAATAT
ACTCTCTTACTCCCCACTCTGCGCGAGAAACCA
```

Présente 97% d'homologie au gène codant l'ARNr 16S de *Lactococcus lactis*. Par conséquent avec un degré de similitude aussi élevé, cet isolat est assigné à l'espèce *Lactococcus lactis*.

Cette étude a été réalisée en suivant l'évolution du nombre de *S. aureus* (ensemencé à  $10^5$  cellules /ml) en fonction du temps (h), en présence de deux taux différents de *Lc. lactis* à savoir  $10^8$  et  $10^9$  cellules /ml.

Un témoin a été également réalisé en cultivant *S. aureus* en culture pure.

Les dénombrements ont été effectués toutes les deux heures pendant 18h puis après 24h d'incubation à 30°C. (Figure 25)



**Figure 25** : Evolution de la croissance de *S. aureus* en culture mixte avec *Lc. lactis* et en culture pure, dans le lait écrémé.

Les résultats rapportés sur la figure25 montrent que la souche de *S. aureus* S7 en culture pure suit une courbe de croissance normale, aborde la phase exponentielle dès le début de la culture, tandis qu'en culture mixte la croissance de *S. aureus* S7 en présence de *Lc. lactis* suit deux allures différentes selon le taux d'inoculation de *Lc. lactis* :

- En culture mixte avec *Lc. lactis* à  $10^8$  cellules/ml :

On remarque qu'il n'y a pas de diminution de la croissance de *S. aureus* son taux augmente à  $10^6$  cellules/ml après 6h de culture, cependant le nombre de *S. aureus*

est nettement inférieur au témoin à partir de la 4<sup>ème</sup> heure de culture, le nombre de *S. aureus* reste stable entre  $10^5$  à  $10^6$  UFC/ml durant les 24h de culture, la croissance est nettement inférieure à celle de *S. aureus* en culture pure cependant aucune diminution de son nombre n'est notée. On suppose que *Lc. lactis* induit une phase stationnaire précoce chez *S. aureus*.

- En culture mixte avec *Lc. lactis* à  $10^9$  cellules/ml :

Pour ce taux d'ensemencement une incontestable diminution du nombre de *S. aureus* est observée à partir de 4 heures d'incubation, son nombre décroît jusqu'à atteindre des valeurs de l'ordre de  $10^3$  UFC/ml après 24h d'incubation.

Cette diminution peut être interprétée par les effets antagonistes de la souche de *Lc. lactis* Lc1, on suppose donc que cette souche a produit des substances ou des métabolites qui inhibent la croissance de *S. aureus*.

Le *ratio* entre l'inoculum de *S. aureus* et de bactérie lactique au début de la culture détermine bien l'efficacité de l'inhibition (Haines et Harmon, 1973) D'après ces résultats la différence d'inhibition de la croissance de *S. aureus* avec les deux différents taux d'ensemencement de *Lc. lactis* à savoir  $10^8$  cellules/ml et  $10^9$  cellules/ml, illustre bien l'importance de ce facteur.

Les mêmes observations ont été faites par Titeli (2007) en étudiant l'antagonisme d'une souche de *Lb. paracasei* à l'égard de *E. coli* entéropathogène vis-à-vis de laquelle une différence d'inhibition significative existait pour les différents taux d'ensemencement de *Lb. paracasei*. Les mêmes observations ont également été faites par Asselate (2006) avec *Lb. acidophilus* à l'égard d'EPEC. Bendali *et al.* (2008) ont rapporté que l'inhibition de *Listeria innocua* par *Lb. paracasei* est dépendante du ratio entre ces deux bactéries, renforçant l'idée que le ratio détermine l'efficacité de l'antagonisme des bactéries lactiques à l'égard des bactéries pathogènes.

Les lactocoques sont capables d'inhiber certains micro-organismes pathogènes et d'altération par la production d'acide lactique en tant que produit majeur de leur métabolisme. Selon Coccagn-Bousquet *et al.* (1996), la fermentation du lait par *Lc. lactis* produit 90% d'acide lactique L(+), cependant de nombreuses études ont prouvé que *Lc. lactis* produisait des acides organiques autres que l'acide lactique par une

déviations de la voie homolactique vers la voie hétéro-lactique, dans des conditions de limitation en nutriments (Rilla *et al.*, 2003) en aérobiose, ce qui mène à la production d'acide acétique et d'acide formique en quantité conséquente (Neves, 2005)

Certains auteurs suggèrent que l'inhibition de *S. aureus* serait due à l'acide lactique en lui-même, celui-ci altérerait la croissance des bactéries indépendamment du pH. (Lindgren et Dobrosz, 1990; Hsiao et Siebert, 1999; Charlier *et al.*, 2008b)

L'effet antagoniste du milieu à pH acide sur la croissance de micro-organismes pathogènes a déjà été observé par Lamprell, (2003); Røssland *et al.* (2003). Des études ont montré que l'acidification du milieu de culture ou du lait par l'addition d'acide lactique jusqu'à un pH de 4,5-4,4, inhibe complètement la croissance de *S. aureus* (Charlier *et al.*, 2008a). Néanmoins en plus de la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques (lactique et acétique) envers *S. aureus* résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération de protons, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Caplice *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2007).

Cependant dans cette étude, comme l'a confirmé le suivi de l'activité acidifiante des souches de *Lc. lactis*, le pH atteint en 24h est de 5,3 or de nombreux résultats dans la littérature confirment que *S. aureus* croit normalement à ces valeurs de pH (Le Marc *et al.*, 2009).

Si le pH et la quantité d'acide lactique ne jouent qu'un rôle mineur dans le phénomène d'inhibition de *S. aureus* on peut supposer que l'arrêt de sa croissance est dû à l'accumulation d'autres substances anti-staphylococciques produites par *Lc. lactis*.

Charlier *et al.* (2008)b ont montré que la croissance de *S. aureus* est significativement inhibée dans le lait en présence de *Lc. lactis* dans des conditions de pH contrôlées ou non, et que *S. aureus* était inhibé par *Lc. lactis* après 5 heures d'incubation alors que le pH était aux environs de 6,4, suggérant que l'acidification n'intervenait pas dans le phénomène d'inhibition de *S. aureus*.

Outre la production d'acides organiques, la compétition pour les nutriments joue un rôle incontestable dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus*, ce dernier est un très mauvais compétiteur, des études ont montré que les co-cultures de bactéries lactiques avec *S. aureus* réduisaient la croissance de ce dernier. Iandolo *et al.* (1965) ont montré que la diminution de la disponibilité des nutriments intervenait dans l'inhibition de *S. aureus* par *Lc. lactis subsp. diacetylactis*. Haines et Harmon (1973) ont également rapporté que la compétition pour les éléments nutritifs telles que la biotine et la niacine, interviendrait dans le mécanisme d'inhibition de *S. aureus* en co-culture avec *Lc. lactis* dans le lait à 30°C.

Le Marc *et al.* (2009) interprètent le phénomène d'inhibition de *S. aureus* en co-culture avec des bactéries lactiques par le modèle de Gimenez et Delgaard, (2004) qui décrit une inhibition basée sur la supposition de l'arrêt de la croissance simultanée de toutes les espèces en présence, lorsque la souche dominante en nombre rentre en phase stationnaire. Cependant, les résultats obtenus montrent que l'inhibition de *S. aureus* est assez précoce et donc apparaît avant que *Lc. lactis* n'atteigne son taux maximal. Le Marc *et al.* (2009) expliquent cela par le fait que *S. aureus* est plus sensible aux métabolites secondaires synthétisés durant la fermentation, Ceux-ci étant plus importants lorsque l'inoculum de départ est grand.

En tenant compte de ces résultats, le taux d'ensemencement de  $10^9$  cellules /ml de *Lc. lactis* est choisi pour l'étude de l'antagonisme dans le fromage.

## VII. Le fromage frais :

Le fromage frais obtenu par coagulation mixte : par l'action conjointe de *Lc. lactis* Lc1 et de la présure, possède une texture crémeuse et onctueuse légèrement ferme avec une légère odeur de beurre frais.



**Figure 26 :** Fromage frais moulé en boîtes de Pétri

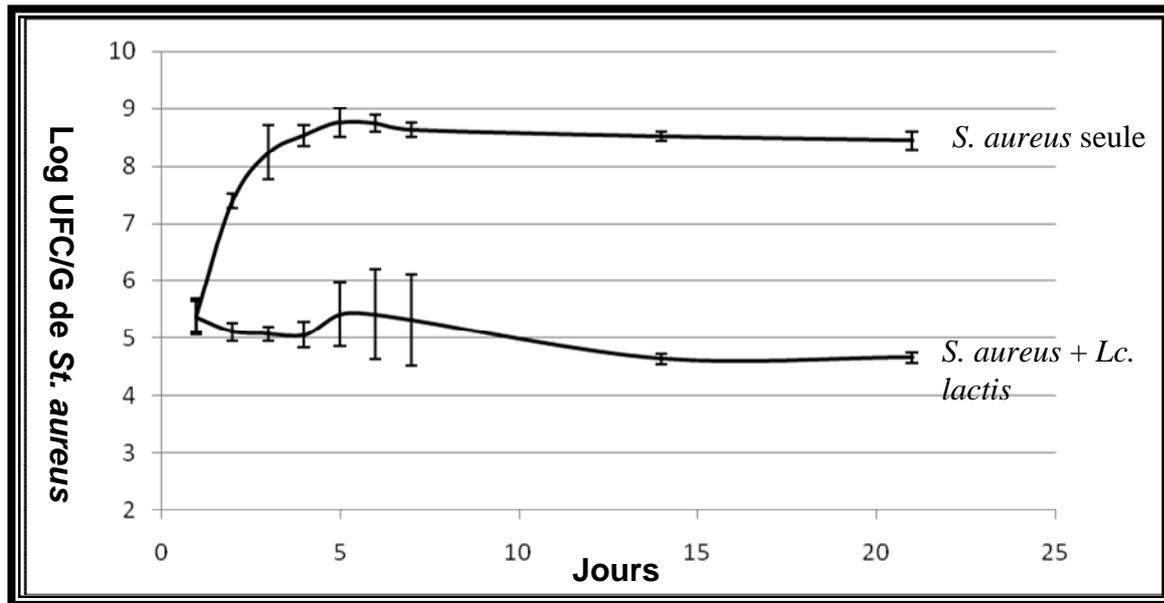
### VII.1. Mise en évidence de l'activité antagoniste de *Lc. Lactis* à l'égard de *S. aureus* résistant aux antibiotiques dans le fromage

L'antagonisme de *Lc. lactis* vis-à-vis de *S. aureus* dans le fromage, a été observé par le suivi de l'évolution de la croissance de *S. aureus* dans le fromage tous les jours pendant 7 jours puis au 14<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> jour.

Pour ce faire, la fabrication d'un fromage frais a été réalisée à raison de 4 répétitions, le fromage a été inoculé avec les souches de *Lc. lactis* et *S. aureus* à des taux respectifs de  $10^9$  et  $10^5$  cellules/ml.

Un témoin a également été réalisé avec la seule souche de *S. aureus* à  $10^5$  cellules /ml. Le lait utilisé est un lait de vache saine de bonne qualité. Le lait a subi un traitement thermique se rapprochant de la tyndallisation à 80°C pendant 10min (trois fois de suite)

Les résultats du suivi sont représentés dans la figure 27:



**Figure 27 :** Evolution de *S. aureus* dans les fromages, seul et en présence de *Lc. lactis* dans le fromage.

Pour le fromage témoin, le nombre de *S. aureus* commence à augmenter à partir du deuxième jour où il atteint une population d'environ  $10^7$  UFC/g, La population de *S. aureus* continue d'augmenter jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour, où elle atteint une population maximale de :  $10^9$  UFC/g, à partir du 6<sup>ème</sup> jour, on observe une légère décroissance pour se stabiliser à  $10^8$  UFC/g au bout du 21<sup>ème</sup> jour.

À l'inverse le fromage fabriqué avec les deux souches *Lc. lactis* et *S. aureus*, une différence hautement significative du nombre de *S. aureus* est observée par rapport au fromage témoin dès le deuxième jour de stockage [ $F_{\text{obs}}$  (9.2627) >  $F_{\text{the}}$  (0.02864)] (Annexe IV).

Du 1<sup>er</sup> au 5<sup>ème</sup> jour, contrairement au fromage témoin, on n'observe pas d'augmentation du nombre de *S. aureus*, celui ci reste pratiquement stable à environ  $10^5$  UFC/g en moyenne. Cette différence très hautement significative traduisant une différence du nombre de *S. aureus* de plus de 2 log par rapport au témoin indique que *Lc. lactis* exerce une activité inhibitrice qui bloque la croissance de *S. aureus*.

À partir du sixième jour, il connaît une remarquable diminution pour atteindre  $10^4$  UFC /g en moyenne au 21<sup>ème</sup> jour. L'addition de la souche de *Lc. lactis* aurait donc permis une réduction très hautement significative de la population de *S. aureus* au bout du 21<sup>ème</sup> jour de stockage [ $F_{obs} (67.66) > F_{the} (0.0004156)$ ] ( annexe IV)

Les résultats obtenus témoignent de l'effet inhibiteur exercé par *Lc. Lactis* sur la croissance de *S. aureus* S7 résistante aux antibiotiques durant toute la période du stockage, une réduction de 4 log de *S. aureus* S7 au 21ème jour de stockage par rapport aux fromages témoins.

Des résultats similaires ont été rapportés par Hamama *et al.* (2002) qui ont utilisé des souches de *Lc. lactis* productrices de nisine et des souches de *Lc. lactis* non productrices de nisine pour la fabrication d'un fromage frais inoculé avec  $10^3$  et  $10^5$  cellules/ml de *S. aureus*. Pour ces deux taux d'ensemencement après 48h, la population de *S. aureus* a augmenté respectivement à  $10^{5.4}$  et  $10^{7.2}$  cellules /ml, au bout de 72h une nette diminution apparaît  $10^{2.25}$  et  $10^{4.14}$  cellules/ml respectivement pour les souches nisine<sup>+</sup>, et pour les deux taux d'ensemencement de *S. aureus* une différence significative existe entre le nombre de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *Lc. lactis* nisine<sup>-</sup> et nisine<sup>+</sup>, pour ces derniers une diminution de 1log de *S. aureus* est observée par rapport au fromage avec les souches nisine<sup>-</sup>, et cela pour un même pH final. Ce qui laisse penser que *Lc. lactis* Lc1 serait bien productrice de substances inhibant la croissance de *S. aureus* dans le fromage.

Rodriguez *et al.* (2000) ont également trouvé que durant la fabrication de fromages avec des souches de *Lc. lactis* productrices de nisine, ces fromages contenaient 0,82log de *S. aureus* de moins que du fromage fabriqué avec des starters commerciaux, indiquant l'importance du rôle des souches productrices de bactériocines dans le contrôle du développement de *S. aureus* dans les fromages.

Les résultats obtenus montrent que la souche de *Lc. lactis* ne révèle son maximum d'effet inhibiteur qu'à partir du 14ème jour de stockage, ce qui laisse envisager l'utilisation de cette souche dans la fabrication de fromages affinés, dans lesquels elle pourrait exercer son effet inhibiteur pendant la période d'affinage.

Rilla *et al.* (2003) ont montré que l'ajout de *Lc. lactis* IPLA729 productrice de nisine Z, isolée de fromage au lait cru, à une culture de starters pour la fabrication d'un

fromage affiné, prévenait le développement de *Clostridium tyrobutyricum*, le nombre de celui-ci a diminué de  $10^6$  à  $10^3$  UFC/g pendant l'affinage de ce fromage, alors qu'il augmente à  $10^9$  dans le fromage témoin.

De Buysse *et al.* (2005), dans une enquête effectuée en France sur une période de 2 ans, ont rapporté que 69 foyers de toxi-infections collectives étaient dus à des produits laitiers, dont 87% dus aux fromages, parmi lesquels 90% impliquaient des fromages affinés, faisant ressortir ainsi toute l'importance de l'utilisation de souches inhibant le développement de germes pathogènes dans les fromages affinés, En effet Morgane *et al.* (2000) ont fabriqué des fromages de chèvre à partir de lait cru volontairementensemencé avec différents *inocula* de *S. aureus*, Deux types de technologies - lactique et présure - ont été employées. Leurs résultats indiquent que le nombre de *S. aureus* décroît régulièrement au cours de l'affinage et de la conservation des fromages lactiques jusqu'à la disparition complète du germe au cours du stockage des fromages. En revanche, le nombre de *S. aureus* reste stable pendant l'affinage des fromages issus d'une technologie présure. Olarte *et al.* (1999) ont étudié la qualité organoleptique ainsi que les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du fromage affiné de type Cameros. *S. aureus* a été détecté uniquement dans les fromages au lait cru, et la population était plus importante dans celui qui n'a pas étéensemencé en lactocoques.

Ces éléments confirment l'effet inhibiteur des lactocoques dans les fromages au lait cru.

Dans une étude réalisée par Rodriguez *et al.* (2005) ont fabriqué un fromage affiné inoculé avec  $6,85 \log$  de *S. aureus* et des bactéries lactiques productrices de pédiocine et d'autres productrices de nisine. Après 30 jours d'affinage le nombre de *S. aureus* dans le fromage fabriqué avec les souches productrices de pédiocine était  $0,57 \log$  inférieur au témoin et  $0,64 \log$  inférieur au témoin pour les souches productrices de nisine. Ainsi, le nombre de *S. aureus* dans les fromages serait bien influencé par la culture lactique et leurs substances produites ainsi que le temps d'affinage. Dans une autre étude Rodriguez *et al.* (1998) ont montré l'efficacité de l'utilisation de souches de *Lc. lactis* productrices de nisine dans un fromage affiné pour inhiber la croissance de *Listeria innocua*, le nombre de celle-ci diminue de 4,08

log après 60 jours d'affinage, indiquant que *Lc. lactis* est un bon compétiteur à l'égard des autres souches en présence et est capable de croître et de produire des substances inhibitrices pendant la fabrication et la période d'affinage des fromages.

Ce qui renforce l'idée d'utiliser *Lc. lactis* dans la fabrication de fromage affiné, pour prévenir le développement des germes pathogènes et d'altération et notamment les souches de *S. aureus* présentant des résistances aux antibiotiques.

On a observé que *Lc. lactis* n'abaissait pas le pH en-dessous de 5,2 après 24h de culture, et ne produisait donc pas assez d'acide lactique pour être conforme à la définition de starter (Beresford *et al.*, 2001). Cependant, elle pourrait constituer une culture protectrice pour le fromage, (une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et/ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible) (Dortu et Thonar, 2009).

Mc Auliffe *et al.* (1999) ont montré l'efficacité de l'utilisation de souches de bactéries lactiques productrices de Lacticine3147 comme souches protectrices à l'égard de *Listeria monocytogenes* dans le fromage. Ghrairi *et al.* (2004) ont rapporté que l'utilisation de lactocoques bactériocinogènes comme agents antibactériens dans l'industrie laitière, pourrait éventuellement, dans des conditions optimales, produire des bactériocines en quantité suffisante pour inhiber complètement la flore de contamination. Nascimento *et al.* (2008), ont trouvé que l'addition de cultures bactériocinogènes de *Lc. lactis* ATCC 11454, *Lb plantarum* ALC01 et *E. faecium* FAIR-E 198 dans des fromages inoculés par *B. cereus*, *S. aureus* ATCC27154 et *L. monocytogenes* Scott A., n'a présenté qu'un léger effet bactériostatique sur *Listeria* et *Staphylococcus*. Ils ont interprété l'absence d'action inhibitrice dans le fromage par la grande activité protéolytique des starters utilisés, qui a neutralisé l'activité des bactériocines au bout du 21<sup>ème</sup> jour. L'utilisation de souches fortement protéolytiques dans le cas d'addition de souches protectrices durant l'affinage des fromages serait donc à proscrire.

*CONCLUSION*

---

## Conclusion

Cette étude a été consacrée à la recherche de souches de lactocoques capables d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* multi-résistant présent dans les laits crus, ces souches de *S. aureus* ont été isolées et identifiées à partir de lait de vaches saines et de vaches mammites avant pendant et après leur traitement, des antibiogrammes de ces souches ont été effectués pour détecter d'éventuelles résistances, une seule souche s'est révélée résistante à la cefoxitine et donc à la méthicilline .

Des bactéries lactiques mésophiles ont été isolées à partir des laits de vache et de chèvre. Parmi les souches isolées, quatorze d'entre elles ont été identifiées sur la base de caractères biochimiques et physiologiques comme étant des souches de *Lactococcus lactis*. Ces souches ont été caractérisées du point de vue technologique par l'évolution du pH et de l'acidité titrable à 30°C, elles ont également été criblées pour leur activité antibactérienne en utilisant le test de "Spot", les résultats ont montré que les souches de *Lactococcus lactis* avaient une bonne activité anti-staphylococcique, et particulièrement à l'égard de *S. aureus* résistant aux antibiotiques. La souche de *Lc. lactis* Lc1, ayant témoigné du meilleur pouvoir antibactérien, a été retenue, et confirmée comme étant *Lactococcus lactis* par le séquençage de l'ARN 16S.

L'effet antibactérien a également été étudié en culture mixte dans du lait écrémé, en présence de  $10^8$  et  $10^9$  cellules de *Lactococcus lactis* /ml. Au terme de cette étude, il a été démontré qu'il existait une nette différence d'inhibition de la croissance de *S. aureus* selon que l'inoculum de départ était de  $10^8$  ou de  $10^9$  *Lc. lactis*/ml. En présence de  $10^9$  de *Lc. lactis* Lc1/ml, une diminution de 5 unités logarithmiques par rapport au témoin a été observée au bout de 24h de culture.

Deux lots de fromage frais ont été fabriqués après inoculation de l'un avec la souche de *Lc. lactis* S1 ( $10^9$ cellules/ml) et la souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline et l'autre avec *S. aureus* seul (témoin). La croissance de *S. aureus* dans

ces fromages a été suivie tous les jours pendant 7 jours, puis au 14<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> une comparaison de l'évolution de cette croissance dans les deux conditions a été effectuée.

Le suivi de la croissance de *S. aureus* a montré que ce dernier était significativement inhibé dans le fromage en présence de *Lc. lactis* Lc1 cela confirme donc l'effet antagoniste de *Lc. lactis* à l'égard de la souche de *S. aureus* résistante aux antibiotiques. Par ailleurs la souche *Lc. lactis* Lc1 ne révèle son maximum d'effet inhibiteur qu'à partir du 14<sup>ème</sup> jour de conservation.

Ces résultats semblent donc militer pour l'emploi de *Lc. lactis* dans la fabrication de fromages affinés au lait cru où *S. aureus* est généralement présent, ce qui ouvrirait de nouvelles perspectives pour prévenir la présence de souches résistantes aux antibiotiques dans les fromages et diminuer le risque de transmission de ces souches à l'homme.

En perspective, cette étude qui reste préliminaire doit être complétée par d'autres études relatives à :

La recherche d'effets antibactériens de *Lactococcus lactis* sur d'autres espèces multi-résistantes dans le lait.

La mise en évidence de la nature des substances antimicrobiennes produites par *Lc. lactis*, leur purification et caractérisation. Cette dernière pourrait éventuellement être une alternative aux antibiotiques pour traiter les mammites et autres maladies où *S. aureus* multi-résistant est impliqué

La détection de la production d'entérotoxines par *S. aureus* dans le lait et l'étude de l'évolution de leur production en culture mixte avec *Lc. lactis*.

La mise au point d'un fromage au lait cru du terroir en suivant durant une période d'affinage plus poussée le devenir de *S. aureus* et de ses entérotoxines éventuellement produites, en présence de *Lc. lactis*.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

## A

**Agiox L.**, 2003. Conception et validation d'un outil d'aide à l'estimation de l'état sensoriel des fromages en cours d'affinage :Application à l'affinage d'un fromage à pâte molle et à croûte fleurie. These pour l'obtention du grade de Docteur de l'Institut National Agronomique de Paris Grignon.144p.

**Alomar, J.**, Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S., Montel, M.C., 2008. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol.* 25, 502-508.

**Alonso-Calleja, C.**, Carballo, G., Capita, R., Bernardo, A. Garcia-Lopez, M.L., 2002. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 134-138.

**Ammor, S.**, Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, L. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility(a) Behaviour of bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food control.* 17, 462-468.

**Andersen, A.Z.**, Carvalhob, A.L., Neves, A.R., Santosb, H., Kummerc, U., Olsena L. F., 2008. The metabolic pH response in *Lactococcus lactis*: An integrative experimental and modelling approach. *Computational Biology and Chemistry.* 33, 71-83

**André, M.C.D.P.B.**, Hidalgo Campos, M.R., Jayme Borges, L., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, A. B., 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion . *Food Control.* 19, 200-207.

**Anonyme**, <http://algerie.el-annabi.com/Algérie6000casen2005d'intoxicationslimentaires.htm>

**Antosia, R. E.**, 2006. *Staphylococcus enterotoxin B*. In “*Handbook of Bioterrorism and Disaster Medicine*” Antosia R. E., Cahill J. D. Springer Science, Business Media LLC Ed Springer US. NewYork. 492p.

**Asselate, A.**, 2006. Intérêt de la mise au pont d'un lait écrémé 1<sup>er</sup> âge fermenté au *Lactobacillus acidophilus* dans la lutte anti-diarrhéique à EPEC. Mémoire de Magister en Microbiologie appliquée.64p.

**Ayad, E.H.E.**, 2009. Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiology* , Article in Press, doi: 10.1016/j.fm.2009.03.007

## B

**Badis, A.,** Guetarni, D., Moussa-Boudjema, B., Henni, D.E., Tornadijod, M.E., Kihal, M., 2004a. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 21, 343-349.

**Badis, A.,** Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E., Kihal, M., 2004b. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21, 579-588.

**Barboza-Corona, J.E.,** de la Fuente-Salcido, N., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2008. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis, *Veterinary Microbiology*. Article in Press, doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.018

**Baselga, R.,** Albizu, I., Amorena, B., 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet. Microbiol.* 39, 195-204

**Bayoub, K.,** Elotmani, F., Assobhei, O., Jaoua, S., et Soukri, A., 2006. Contribution à l'étude des bactéricines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raib ». Congrès international de Biochimie Agadir. 9-12

**Beal, C.** et Sodini, I., 2003. Fabrication des yaourts et des produits laitiers fermentés. Techniques de l'ingénieur, Traité agro-alimentaire. Dossier n°F6315,

**Bendali, F.,** Gaillard-Martinie, B., Hebraud, M., Sadoun, D., 2008. Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* antilisterial bacteriocin, an Algerian isolate. *LWT-Food science and technology.* 41, 1784-1792.

**Ben Hassen, S.,** Messadi, L., Ben Hassen, A., 2003. Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. *Ann. Méd. Vét.* 147, 41-47

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

**Bhunja, A. K.** 2008. *Staphylococcus aureus*. In "*Foodborne Microbial Pathogens*". Eds Springer Science, Business Media LLC. Springer. New York. 276p.

**Bouquien YC,** Corrieu G, Desmazeaud J.M., 1988. Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2527-2531.

**Bradley, A.J.,** 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal.* 164, 116-128.

**Breukink, E.**, 2006. A lesson in efficient killing from two-component lantibiotics. *Molecular Microbiology*. 61(2), 271–273

## C

**CA-SFM**, 2008. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2008.

**Canteri G.**, 1997. Les levains lactiques, In « Le Fromage de la science à l'assurance-qualité ». Eds: Eck A., Gillis J.C., Lavoisier Tee and Doc, Paris. 891p.

**Caplice, E.**, Fitzgerald G.F., 1999. Food fermentations, role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2), 131-49.

**Castala, E.**, Montel, M. C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. *I.J. Food Microbiol.* 126, 271-273

**Cenatiempo, Y.** Berjeaud, J.M., Biet F., Fremaux, C, Hechard, Y. Robichon, D.1996. Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait : Dairy science and technology.* 76, 169-177.

**Centeno, J.A.**, Cepeda, A., Rodriguez-Otero, J.L., 1996. Lactic acid bacteria isolated from Arzua cows' milk cheese. *Dairy Journal.* 6, 65-78.

**Chambers HF.**, 1988. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1(2),173-186.

**Charlier, C.**, Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y., 2008a. Interaction between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1), 30-39.

**Charlier, C.**, Even, S., Gautier, M. et Leloir, Y. 2008b. Acidification is not involved in the early inhibition of *S.aureus* growth by *Lc. Lactis* in milk. *Int. Dairy journal.* 18, 197-203

**Charron, G.**, 1988. Pathologie des troupeaux laitiers. In les productions laitières (tome 2) : conduite technique et économique du troupeau. Ed. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. 292p.

**Cheriguene, A.**, Chougrani, F., Bekada, A. M. A., El Soda, M., Bensoltane, A. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. *African Journal of Biotechnology.* 6(15), 1854-1861.

**Cleveland J**, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML.,2001., Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71(1), 1-20.

**Cocaign-Bousquet M.**, Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D., 1996 .Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70, 253–267

**Cocaign-Bousquet, M.**, Even, S., Lindley, N. D., Loubière, P., 2002. Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. *Appl Microbiol Biotechnol* . 60, 24–32.

**Cogan, T.**, Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P., Gomez, R. **1997**. Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64(3), 409–421.

**Contreras, A.**, Sierra, D., Sanchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J., Gonzalo, C., 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 68, 145-153.

**Corbier, C.**, Kier, I., Mulliert, G., Vitoux, B., Revol-Junelles, A.M., (2001). Biological Activities and Structural Properties of the Atypica Bacteriocins Mesenterocin 52B and Leucocin B-TA33a. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4), 1418-1422

**Cotter, P.D.**, Hill, C., 2003. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol. mol. Biol. rev.* 67(3), 429–453

**Cotter, P.D.**, Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. A review. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 777-788.

## D

**Dacosta, Y.**, 2000. La bio-protection des aliments : antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologiques. Ed. Tec. et Doc., Yves Dacosta, Paris. 229p.

**Daeschel**, 1989, cité par Drosinos, E.H., Mataragas, M., Metaxopoulos, J., 2005. Biopréservation: a New Direction Towards Food Safety. In: ‘New Development in Food Research. RILEY, A. P. Ed NOVA Science Publisher Inc. New York. P. 31-64.

**Dahl, A.T.**, Midden, R., Hartman, E.P., 1989. Comparison of Killing of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. *Journal of bacteriology*. 171(4), 2188-2194.

**Danman, P. M.**, Projan S. J., 2001 Regulation of virulence in the Staphylococci. In “*Staphylococcus infection and diseases*” HONEYMAN, A.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. Springer. New York. 342p

**De Buyser, M-L.**, Brisabois, A., Espié, E., Delmas, G., Dufour, B., 2005. implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d’origine alimentaire en France de 1988 à 2003. AFSSA. Bulletin épidémiologique. N°16, 1-6.

**De Buyser, M-L.,** Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. Review article. *I. J. Food Microbiol.* 67, 1–17.

**De Roissard, H.B** et Luquet, F.M., 1994. Bactéries lactiques : Aspect fondamentaux et , technologiques. Ed. *Lorica*. France .. Tome I :25-590.

**Dellaglio, F.,** de Roissard, H., Torriani, S. et Curk, M. C., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques. De Roissard, H. et Luquet, F. M. Ed. *Lorica*, I : 25-116, 605p.

**Desmazeaud, M.** 1998. Bactéries lactiques et qualités des fromages. Laboratoire de recherches laitières INRA.

**Devriese, L. A.,** Vandamme, L. R., Fameree, L.. 1972. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zbl. Vet. B.* 19, 598-605.

**Do Carmo, L. S.,** Dias, R.S., Linardi, V.R., De Sena, M.J., Santos, D.A., De Farida, M.E., Pena, E.C., Jett, M., Heneine, L.G., 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and rawmilk in Brazil. *Food Microbiol.*, 19, 9-14

**Dortu, C.,** Thonart, P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154

**Dufour A.,** Hindré T., Haras D. et Le Pennec J. P. (2007). The biology of lantibiotics from the lactacin481 group is coming of age. *FEMS Microbiol Rev.* 31, 134–167

## E

**El Solda, M.,** 1993. The role of lactic cheese ripening acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiology Reviews.* 12, 239-252.

**Elegado, F.B.,** Kim W.J., Kwon, D. Y., 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin ACM, from *Pediococcus acidilactici* M. I. *J. Food Microbiol.* 37, 1-11.

**Elliot, T. R.,** 2001. Public Health Concerns. In “Applied dairy microbiology” second edition. ELMER H. MARTH, JAMES L. STEELE. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 705p.

**Ennahar, S.,** Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, Y., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews.* 24, 85-106.

EU, 2003. DIRECTIVE 2003/99/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. Official Journal of the European Union. 12/12/2003.

## F

**Fernández, M.**, Martinez-Bueno, M., Martin, M. C., Valdivia, E. and Maqueda, M., 2007. Heterologous exoexpression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1350-1361.

**Fernandes, C. J.**, Fernandes, L. A., Collignon, P., 2005. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 506-510.

**Flambard, B.**, Richard, J., Juillard, V., 1997. Interaction between Proteolytic Strains of *Lactococcus lactis* Influenced by Different Types of Proteinase during Growth in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(6), 2131–2135.

**Fox, L.**, Bayles, K.W., Bohach, G.A. 2001. *Staphylococcus aureus* Mastitis. In “*Staphylococcus aureus Infection and Disease*” . HONEYMAN A.L., FRIEDMAN H., BENDINELLI M. Ed Kluwer Academic Publishers. Springer US. New York. 342p.

**Fuda, C.C.S.**, Fisher J. F., Mobashery S. 2005. b-Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2617–2633

## G

**Galvin, M.**, Hill, C., Ross, R.P., 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in Applied Microbiology.* 28, 355–358.

**Garneau, S.**, Martin, I.N., Vederas, J. C., 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria . *Biochimie* . 84, 577-592 .

**Geis, A.**, Singh, J., Teuber, M., 1983. Potential of Lactic Streptococci to Produce Bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(1), 205-211.

**Getahun, K.**, Kelay, B., Bekana, M., Lobago, F., 2008. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 40, 261–268.

**Ghrairi, T.**, Frère, J., Berjeaud, J. M. and Manai, M., 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 389-398.

**Ghrairi, T.**, Manai, M., Berjeaud, J.M., Frère, J., 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *J. Appl. Microbiol.* 97, 621-628.

**Giménez, B.**, Dalgaard, P., 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeriamonocytogenes* and spoilage microorganisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96, 96-109.

**Goñi, P.**, Vergara, Y., Ruiz, J., Albizu, I., Vila J., Gómez-Lus, R., 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *I. J.f Antimicrobial Agents.* 23, 268–272.

**Götz, F.**, Bannerman, T., et Schleifer, K.H., 2006.. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In” The prokaryotes” 3eme edition . *Ed Springer , New York.* 5-75

**Grattepenche, F.** Audel, P., Lacroix, C., 2007. Milk fermentation by fonctional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *I. Dairy.Journal.* 17, 123-132.

**Gravesen A.**, Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jansch, L., Héchard, Y., Hastings., J.W., Knøchel, S., 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, 148, 2361-2369.

**Gruet, P.**, Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V., 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 50, 245–259.

**Guiraud, J. P.**, 2003. Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 651p.

**Guiraud, J.P.**, Rosec, J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. France. 298p.

**Guiraud, J.P.**, Galzy, P., 1980. l’analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition de l’usine nouvelle Paris. 239p.

## H

**Hadadji M.**, Bensoltane A., 2006. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat’s milk. *Afr. J. Biotechnol.* 5(6), 505-509.

**Haines, W. C.**, Harmon, L. G. 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 25, 436–441.

**Hamama, A.,** Bayi, M., 1991. Composition and microbiological profile of two Moroccan traditional dairy products: raib and jben. *Journal of the Society of Dairy Technology*. 44(4), 118–120.

**Hamama, A.,** El Hankouri, N., El Ayadi, M., 2002. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *International Dairy Journal*. 12, 933-938.

**Hassan, A. N.,** Frank, J. F., 2001. Starter Cultures and Their Use. In “Applied *dairy microbiology*” second edition. ELMER H. MARTH, JAMES L. STEELE. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 705p.

**Héchar, Y.,** Sahl, H.G., 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Elsevier. *Biochimie*. 84, 545-557.

**Heng, N. C.K.,** Wescombe, P. A., Burton G. P., Jack, R.W. Tagg, J. R., 2007. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In “« Bacteriocins: Ecology and Evolution »”. Riley M. A., Chavan M. A. Ed. Springer. Berlin Heidelberg. 45-92.

**Herranz, C.,** Chen, Y., H.J., Cintas L.M., Hernandez, P.E., Montville, T.J., Chikindas, M.L., 2001. Enterocin P Selectively Dissipates the Membrane Potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4), 1689-1692

**Holo, H.,** Faye, T., Brede, D.A., Nilsen, T., Ødegård, I., Langsrud, T., Brendehaug, J., Nes, I., 2002. Bacteriocins of propionic acid bacteria. *Lait* 82, 59-68.

**Hsiao, C-P.,** Siebert, K., 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *I. J. Food Microbiol.* 47, 189-201.

## I

**Iandolo, J. J.,** Clark, C.W., Bluhm, L., Ordal, Z.J., 1965. Repression of *Staphylococcus aureus* in Associative Culture. *Appl. Microbiol.* 13(5), 646-649.

**Ito, A.,** Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., Toba, T., 2003. The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *current microbiology*. 47, 231–236

## J

**Jack, R.W.,** Johnr, R., Tagg, A., Bibek, R., 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*. 59 (2), 171-200.

**Janssen, M.,** Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Houteghem, N.V., Vereecken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F., Impe, J. 2007. Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5), 1601-1611.

**Jay, J. M.,** Loessner M. J., 2005. Staphylococcal gastroenteritis. In “ Modern food microbiology” 7th edition. Food Science Text Series. Ed. Springer US. New York. 790p.

**Jay, H.J.,** 1982. Antimicrobial properties of diacetyl, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 525-532

**Jeanson, S.,** Berthier, F., Grappin, G., Beuvier, E., 2003. Heat resistance of wild *Lactococcus lactis* strains under a thermal gradient of cooked cheese, in milk and mini-cheeses. *EDP Science*. 83, 379-396.

**Jones, R.J.,** Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G., Tagg, J.R., 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *J. Food Microbiol.* 25(2), 228-234.

**Juncioni de Arauz, L.,** Faustino Jozala, A., Gava Mazzola, P., Vessoni Penna, T.C., 2009. Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends in Food Science & Technology*. Article in Press, doi:10.1016/j.tifs.2009.01.056

## K

**Kaszanyitzky-Juhász, E.,** Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, A. van der Graaf-van Bloois, L., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A. 2007. MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerging infectious disease*. 13(4), 630-632

**Kérouanton, A.,** Hennekinne J.A., Letertre C., Petit L. Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*. 115, 369–375.

**Khedid, K.,** Faid, M, Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. 2006. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research*. 164(1), 81-91.

**Kim, W. S.,** Ren, J., Dunn, N. W., 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters* 171, 57-65.

**Kimoto, H.,** Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T., Ohmomo, M., 2004. Identification and probiotic Characteristics of *Lactococcus* Strains from plant materials. *Japan International Research Center for Agricultural Sciences*. 38(2), 111-117.

**Klaenhammer, T. R.,** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-86.

**Klaenhammer, T. R.,** Fermaux, C. et Hechard, Y., 1994. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. In bactéries lactiques. de Roissart, H. et Luquet, F. M. Ed. Loriga. 605p.

**Kwon, N. H.,** Park, K.T., Moon, J. S., Jung, W.K., Kim, S.H., Ki, J. M., Hong, S.K., Koo, H.C., Joo, Y. S., Park, Y.H., 2005. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 56, 624–632

## L

**Lamprell, H.,** 2003. La production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génetique des souches de *Staphylococcus aureus*. Poligny, France: University of Bourgogne. 223p.

**Larpent, J. P.,** 1996. Les bactéries lactiques. In Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentations alimentaires Bourgeois, C. M. et Larpent, J. P. Ed. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. Tome 2, 523p.

**Le Loir, Y.,** Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2(1), 63-76.

**Le Marc, Y.,** Valík, L., Medve'ová, A., 2009. Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *I. J. Food Microbiol.* 129, 306–311

**Leal, M. V.,** Baras, M., Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B. et Jiménez\_Diaz, R., 1998. Bacteriocin production and competitiveness of *Lactobacillus plantarum* LPCO10 in olive juice broth, a culture medium obtained from olives. *I. J. Food Microbiol.* 43, 129-134.

**Leal, M.V.,** Baras, M., Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B., Jiménez-Diaz, R., 1998. Bacteriocin production and competitiveness of *Lactobacillus plantarum* LPCO10 in olive juice broth, a culture medium obtained from olives. *I. J. Food Microbiol.* 43, 129-134.

**Leroy, F.,** De vuyst, L., 2000. Sakacins in natural food microbial systems. *CRC press, London*: 589-610.

**Letondeur, V.,** Lafarge, et Lahellec, C., 1997. Aspects hygiéniques. In le fromage : de la science à l'assurance qualité. Eck, A. et Gillis, J. C. 3<sup>ème</sup> édition Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. 891p.

**Lindgren, S.E.,** Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*. 87, 149-164.

**Lollai, L.A.,** Ziccheddu, M., Di Mauro, C., Manunta, D., Nudda, A., Leori, G., 2008. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995–2004). *Small Ruminant Research* 74, 249–254.

**Lopez-Diaz, T.M.,** Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M.L., Moreno, B., 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.* 17, 23–32.

**Lotter, L.P.,** Leistner, L., 1978. Minimal Water Activity for Enterotoxin A Production and Growth of *Staphylococcus aureus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 36(2), 377-380.

**Lucas, S.,** Reyrolle, J., 1989. Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles. Equilibre des flores au cours de la première étape de la fabrication du levain. *Lait.* 69(2), 121-130.

**Lucey, J. A.,** 2002. ADSA Fondation Scholar Award, Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J. Dairy Sci.* 85, 281-294

**Luquet, F.M.,** 1985. Lait et produits laitiers: vache, brebis, chèvre. 3 volumes. Technique et Documentation, Lavoisier. Paris. 122p.

**Lyon, W.J.,** Glatz, B., 1991. Partial Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(3), 701-706.

**Lyon, W.J.,** Glatz, B., 1993. Isolation and Purification of Propionicin PLG-1, a Bacteriocin Produced by a Strain of *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1), 83-88.

## M

**Mas, M.,** Gonzalez-Crespo, J., 1992. Bacterias laticas en el queso de los Ibores. *Alimentaria Marzo* 92, 41-43. Cité par Alonso-Calleja, 2002.

**Mathieu, J.,** 1998. Du sang au lait à travers la glande mammaire. In initiation à la physicochimie du lait. Ed . Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. 214p.

**Mathot, A. G.,** Béliard, E. et Thuault, D., 1996. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In *Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Bourgeois, C.M. et Larpent, J. P. Ed. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. Tome 2, 523p.

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

**Melchior, M.B.,** Vaarkamp, J. Fink-Gremmels, H., 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal.* 171, 398-407

**Mofredj, A.,** Bahloul, H. et Chanut, C., 2007. *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste. Revue générale. *Médecine et Maladies infectieuses.* 37, 200-207.

**Montel,** 2004. Bienvenue chez Microflore. INRA-Aurillac.  
<http://www.cndp.fr/RevueTDC/870-66116.htm>.

**Moon, J.S.,** Lee, A.-R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y. H., Park, Y. H., Joo, Y.S., Koo, H. C., 2007. Phenotypic and Genetic Antibiogram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.* 90, 1176–1185

**Morgan, F.,** Bonnin, G., Meyrand, A., Mazuy, C., Mallereau, M.P., Perrin, G., Vernozzy-Rozand., 2000. Comportement de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* dans les fromages de chèvre au lait cru. *Renc. Rech. Ruminants.* 7, 351-354.

**Morgan, S.M.,** O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2005. Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(7), 2606-2611.

**Morisset, D.,** Berjeaud, J.M., Frère, J., Héchard, Y., 2005. Bacteriocines de bacteries lactiques. In *Bacteries lactiques et probiotiques*. Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires. Lavoisier. Paris. 307p.

## N

**Nascimento, M.S.,** Moreno, I., Kuaye, A.Y., 2008. Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology.* 61( 4) 352-357.

**Neves A. R ,** Wietske A. Pool, W.A., Kok, J., Kuipers, O. P., Santos H., 2005. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology Reviews.* 29, 531–554

**Nickerson, S.C.,** 2008. Control of heifer mastitis: Antimicrobial treatment—An overview. *Vet.Microbiol.* 134(1-2), 128-135.

**Nilsen, T.,** Nes, I.F., Holo, H., 2003. Enterolysine A, a cell wall- degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Env. Microbiol.* 69(5), 2975-2984.

**Nomura, M.**, Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., Okamoto, T., 2006. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J. Appl. Microbiol.* 101, 396–405

**Normanno G.**, La Salandra, G. Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Paris, A., Santagad, G., Firinu, A., Crisetti E., Celano G.V. 2007a. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *I. J. Food Microbiol.* 115, 290–296.

**Normanno, G.**, Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C. Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A.L., Virgilio, S., Celano, G.V. 2007b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *I. J. Food Microbiol.* 117, 219–222.

**Normanno, G.**, Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A. Decastelli, L., Mionid, R., Scutoae, S. Bolzonif, G., Di Giannataleg, E., Salinettih, A.P., La Salandrai G., Bartolij M., Zuccon F., Pirinob, T. Sias S., Parisii A., Quagliaa N.C., Celano G.V., 2005. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *I. J. Food Microbiol.* 98, 73–79

**Nunez, M.**, Medina, M., 1980. Les microcoques et les staphylocoques dans le fromage bleu de Cabrales. *Lait.* 60, 171-183.

## O

**Oh, S.**, Kim, S.H., Ko, Y., Sim, J.H., Kim, K.S., Lee, S.H., Park, S., Kim, Y.J., 2006. Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria. *Food and Chemical Toxicology.* 44, 1184-1190.

**Oleivera, A. P.**, Nielsen, J., Förster, J., 2005. Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiology.* 5, 39.

**Olson, N. F.**, 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Reviews.* 87, 131-148.

**Oscariz, J. C.**, Pisabarro, A. G., 2001. Classification and mode action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positives bacteria. *International. Microbiology.* 4, 13-19.

## P

**Pedersen, M. B., Iversen, S. L., Sørensen, K. Ib., Johansen, E.**, 2005. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 29, 611–624.

**Peles F.,** Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K. , Keresztúri, K., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó A., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 186-193

**Psoni, L.,** Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki E. 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greekcheese from raw goat's milk. *Food Microbiol.* 20, 575–582.

## R

**Reinoso, E.B.,** El-Sayed, A., Lammler, C., Bognia, C., Zschock, M., 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research.* 163, 314-322.

**Richard, C., Drider, D.,** Fliss, I., Debery, S., Pervosti, H., 2006. Generation and utilization of Polyclonal Antibodies to a Synthetic C-Terminal Amino Acid Fragment of Divericin V41 , a Class IIa Bacteriocin. *Appl. And Environ. Microbiol.* 70, 248-254

**Rilla, N.,** Martinez, B., Delgado, T., Rodriguez, A.,2003. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *I. J. Food Microbiol.* 85, 23– 33.

**Rodriguez, AE.,** Gaya, P., Nunez, M., Medina, M., 1998. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *I. J. Food Microbiol.* 39,129-132.

**Rodriguez, E.,** Arqués, J. L., Gaya, P., Nunèz, M., Medina, M., 2000. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. *Milchwissenschaft*, 55, 633-635

**Rodriguez, E.,** Calzada, J., Arqueésa, J.L., Rodriguez, J.M., Nunèz, M., Medina, M., 2005 Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal.* 15, 51–57

**Røssland, E.,** Andersen Borge, G.I., Langsruda, T., Sørhauga, T., 2003. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *I. J. Food Microbiol.* 89, 205-212.

**Ruhr, E. et** Sahl, H-G., 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2), 131-49

## S

**Sahl, H. G.**, 1985. Influence of the Staphylococcinlike Peptide Pep 5 on Membrane Potential of Bacterial Cells and Cytoplasmic Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.*, 162, 833-836

**Sanders, J. W.**, Venema, G., Kok, J., 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*. 23: 483-501

**Settanni, L.** Massitti, O. Van Sinderen, D., Corsetti, A., 2005. *In situ* activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation, *J. Appl. Microbiol.* 99, 670–681.

**Sevin , E.**, Larmaraud-Sevin, O., Legrand, P., 1999. Approche moléculaire de la résistance à la méticilline de *Staphylococcus aureus*. *Revue française des laboratoires*. 315, 25-31.

**Schillinger, U.** et Lücke, F. K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.

**Smit, G.**, Smit B.A., Wim, J.M. Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 591–610

**Smyth, R.W.**, Kahlmeter G., 2005. Mannitol salt agar-cefoxitin combination as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 43(8), 3797-3799.

**Soussy, C-J.**, 2007. Résistance bactérienne aux antibiotiques. In “Les infection urinaires” Springer-Verlag. Paris. 236p.

**Stoyanova , L. G.**, Egorov, N. S., Fedorova, G. B., Katrukha, G. S., Setrusov, A. I., 2007. A Comparison of the Properties of Bacteriocins Formed by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains of Diverse Origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43(6), 604–610.

**Sutra, L.** 1998. *Staphylococcus aureus*. In Manuel de bactériologie alimentaire. Sutra, L., Federighi, M. et Jouve, J. L. Ed. Poly tech. 308p.

## T

**Tagg, J.R.** et McGiven, A.R., 1971. Essay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*. 21(5), 943.

**Tahara, T.**, Oshimura, M., Umezawa, C., Kanatani k, Abs., 1996. Isolation, Partial Characterization, and Mode of Action of Acidocin J1132, a Two-Component Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3), 892-897.

**Taponen, S.**, Pyorala, S., 2008. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*?. *Vet. Microbiol.* 134(1-2), 29-36.

**Teuber, M.** et Geis, A., 2006. The Genus *Lactococcus*. In “ *The Prokaryotes* ”3eme edition. A hand book of biology of bacteria. *Ed Springer*. New York. 205-228.

**Thivierge, N.**, 1999. Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* pour le développement de ferments mésophiles à aptitudes fromagères élevées (Cheddar). Mémoire pour l'obtention du grade de maitre ès sciences (M. Sc.).Laval. 163p.

**Titeli, F.**, 2007. Intérêt probiotique d'un alicament anti-EPEC à base de *Lactobacillus paracasei*. Mémoire de Magister en microbiologie appliquée. 63p.

**Todorov, S.D.** et Dick, 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(4), 305-316.

**Tran, U.**, Boyle, T., Shupp, J. W., Hammamieh, R., Jett, M., 2006. Staphylococcal enterotoxin B initiates protein kinase C translocation and eicosanoid metabolism while inhibiting thrombin-induced aggregation in human platelets. *Molecular and Cellular Biochemistry* 288, 171-178.

## U

**Uteng, M.**, Hauge, H., Brondz, I., Nissen-Mayer, J., Fimland, G., 2002. Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 952-956

## V

**Vadamode, G.**, Chirief J., Scorza O. C., 1981. An examination of the minimal water activity for *S. aureus* ATCC6538P growth in laboratory media Adjusted with less conventional solutes. *Journal of food science.* 47(4), 1259-1262.

**Vadyvaloo, V.**, Arous, S., Gravesen, A., Héchar, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.W., Rautenbach, M., 2004. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology.* 150, 3025–3033.

**Van Duijkeren, E.**, Box, A.T., Heck, M.E., Wannet, W.J., Fluit, A.C., 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol.* 103, 91–7.

**Vandenbergh, P. A.**, 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews.* 12, 221-238.

**Vernozy-Rozand, C.**, 1997. Méthode d'identification des staphylocoques. In microbiologie alimentaire : techniques de laboratoire. Larpent, J. P. Ed. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. 1073p.

**Vessoni Penna, T. C.**, Jozala, A. F., Gentile, T. R., Pessoa Jr., A., Cholewa, O., 2006. Detection of nisin expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the effects of nisin with EDTA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-346.

## W

**Weese, J.S.**, Duijkeren, E.V., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 4354, 1-12.

**White, E.C.**, Hinckley, L.S., 1999. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research.* 33, 117-121

**Wiedemann, I.**, Böttiger, T., Bonelli, R.R., Wiese, A., Hagge, S.O., Gutschmann, T., Seydel, U., Deegan, L., Hill, C., Ross, P., Sahl, H.G. 2006. The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147 - a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.* 61(2), 285-296.

**Willey, J.M.**, van der Donk, W.A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 477-501.

## Y

**Yang, Z.**, 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria : structures and properties. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur. Department of Food Technology - University of Helsinki.

## Z

**Zalán, Z.**, Németh, E., Baráth, A., Halás, A., 2005. Influence of Growth Medium on Hydrogen Peroxide and Bacteriocin Production of *Lactobacillus* Strains. *Food Technol. Biotechnol.* 43 (3), 219-225

**Zhang, S.**, Stewart G. C., 2001. Staphylococcal Enterotoxins. In “*Staphylococcus aureus Infection and Disease*”. HONEYMAN A.L., FRIEDMAN H., BENDINELLI M. Ed Kluwer Academic Publishers. Springer US. New York. 342p.

# *ANNEXES*

## ANNEXE I

## Composition des milieux de culture

(En g/L)

Tableau I : Gélose Chapman

COMPOSITION	(grammes/litre)
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Peptone	10
Gélose	15
Mannitol	10
Rouge de phénol	0.025
Ph7.4	

Tableau II : Gélose Mueller Hinton

COMPOSITION	(grammes/litre)
Infusion de viande de bœuf	300
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	17
pH 7,4	

Tableau III : Bouillon nutritif

Composition	grammes/litres
Maceration de viande	1
Peptone tryptique	15
NaCl	5
pH 7,7	

**Tableau IV: Bouillon M17 :**

<b>COMPOSITION</b>	<b>(grammes/litre)</b>
Tryptone	5,0
Peptone de soja	5,0
Infusion de viande	5,0
Extrait de levure	2,5
Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium	0,25
Glycérophosphate disodique	19,0
pH 6,9 ± 0,2	
Autoclaver à 120°C/20min	

**Tableau V : Milieu cœur-cerveau (BHI)**

<b>Composition</b>	<b>grammes/ litres</b>
Infusion de cervelle de veau	200
Infusion de coeu de beuf	50
Peptone de gélatine	10
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2,5
Glucose	2
Ph 7,4	

**Tableau VI: Milieu PCA(Plate Count Agar).**

<b>COMPOSITION</b>	<b>(grammes/litre)</b>
peptone	5
extrait de levure	2,5
Glucose	1
Agar	15
PH : 7	
Autoclaver à 120°C/20min	

**Tableau VII : Eau physiologique :**

Eau distillée.....1l  
Chlorure de sodium.....9g

PH=7 et autoclaver à 120°C/20min

## ANNEXE II

## Données bibliographiques

**Tableau I :** Propriété d'identification et d'indentification de *Lc. lactis* (Teuber et Geis 2006)

Propriétés	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>
Croissance à 10°C	+	+
Croissance à 40°C	+	-
Croissance à 4% NaCl	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	-	-
Croissance a pH 9.2	+	-
Croissance en présence de bleu de méthylène à 0,1%	+	-
Production de NH <sub>3</sub> à partir de l'arginine	+	-
Production de CO <sub>2</sub>	-	-
Fermentaion du maltose	+	Rarement

**Tableau II :** Caracteristiques des Especies de Lctococcus (Kimoto *et al.* 2004)

Caracteristiques	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>Horniae</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	
Croissance à 45°C	-	-	-	-	
Croissance à pH 9,6	-	-	-	+	
Fermentation de sucres	Tréhalose	+	+	-	+
	Lactose	+	+	-	+
	Arabinose	-	+	-	-
	Fructose	+	+	+	+
	Raffinose	-	-	-	+



Tableau IV : Diamètres des zones d'inhibition édités par le CFA-SFM, 2009

Antibiotiques	Abréviation	S	R
Céfotaxime	CTX	≥ 27	< 15
Ceftazidime	CAZ	≥ 21	< 15
Céfalexine	CN	≥ 18	< 12
Ampicilline	AM	≥ 21	< 16
Amoxicilline	AMX	≥ 23	< 16
Oxacilline	OX	≥ 20	< 20
Céfoxitine	FOX	≥ 27	< 25
Imipénème	IMP	≥ 22	< 17
Pipéracilline	PIP	≥ 20	< 12
Pipéracilline-tazobactam	TZP	≥ 21	< 14
Amoxicilline-clavulanate	AMC	≥ 21	< 14
Tétracycline	T	≥ 23	< 21
Ticarcilline-clavulanate	TCC	≥ 22	< 18
Aztréonam	ATM	≥ 23	< 17
Gentamicine	GN	≥ 20	< 20
Tobramycine	TOB	≥ 16	< 14
Kanamycine	KAN	≥ 17	< 15
Chloramphénicol	C	≥ 23	< 23
Péfloxacine	PEF	≥ 22	< 16
Erhitromycines	E	≥ 22	< 19

## Annexe III

## Résultats

**Tableau I** : Diamètres des zones d'inhibition des souches de *Lc. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* par le test des spots (en millimètre) :

Souches testées	Diamètres des zones d'inhibition									
	S. aureus A	S. aureus B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S11
Lc1	22	30	25	28	28	25	13	15	<b>31</b>	31
Lc2	20	25	22	20	21	19	15	14	<b>30</b>	30
Lc3	20	20	21	21	19	20	11	10	<b>28</b>	25
Lc7	21	27	25	27	28	24	15	16	<b>31</b>	/
Lc9	19	21	19	23	25	22	/	/	<b>16</b>	20
Lc10	20	23	18	23	15	22	10	11	/	19
Lc11	20	25	16	26	12	24	12	/	/	13
Lc12	17	21	14	20	15	24	10	13	<b>20</b>	15
Lc13	20	20	14	20	16	23	13	/	<b>17</b>	/

**Tableau II** : Cinétique de la croissance de *S. aureus* (Log du nombre de cellules/ml) en culture pure dans du lait écrémé :

Inoculum de départ environ  $10^5$  cellules/ ml

	Log du nombre de cellules /ml de <i>S. aureus</i>	
0H	5,23	5,42
4H	6,3	6,012
6H	7,31	7,14
8H	7,69	7,8
10H	8,03	7,97
14H	8,17	8,42
18H	8,24	8,37
24H	8,57	8,42

**Tableau III** : Cinétique de la croissance de *S. aureus* (Log du nombre de cellules/ml) en culture mixte avec *Lc. lactis* :

Inoculum de départ : *Lc. lactis* à  $10^8$  cellules/ ml

*S. aureus* à  $10^5$  cellules/ ml

	Log du nombre de cellules /ml de <i>S. aureus</i>	
0H	5,4	5,32
4H	5,63	5,7
6H	5,6	5,61
8H	5,95	5,74

10H	6	5,98
14H	6,13	6,17
18H	6,2	6,32
24H	6,2	6,65

**Tableau IV:** Cinétique de la croissance de *S. aureus* (Log du nombre de cellules/ml) en culture mixte avec *Lc. lactis* :

Inoculum de départ : *Lc. lactis* à  $10^9$  cellules/ ml  
*S. aureus* à  $10^5$  cellules/ ml

	Log du nombre de cellules /ml de <i>St. aureus</i>	
0H	5,38	5,4
4H	5,35	5,4
6H	5,47	5,40
8H	5,41	5,36
10H	4,95	5,1
14H	4,66	4,9
18H	4	4,4
24H	3,69	4,2

### Cinétique d'acidification :

**Tableau V:** Acidité titrable des souches de *Lactococcus lactis*

Temps (h)	Acidité titrable en °D				
	S1	S2	S3	S7	S9
0	17	17	17	17	17
4	22	17	17	18	18
6	26	20	19	21	20
8	28	23	22	24	24
10	31	25	24	26	26
12	34	26	26	28	28
14	34	27	27	30	32
16	36	30	30	32	35
18	40	33	32	35	37
22	43	35	35	37	39
24	46	36	37	39	41

**Tableau VI:** pH des souches de *Lactococcus lactis*.

Temps (h)	S1	S2	S3	S7	S9
0	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
4	6,35	6,4	6,37	6,2	6,4
6	6,124	6,31	6,35	6,13	6,2
8	6,1	6,26	6,26	6	6,15
10	6	6,2	6,2	5,95	6,12
12	5,9	6,152	6	5,9	6,1
14	5,7	6,12	5,9	5,86	6
16	5,627	6,054	5,9	5,77	5,9
18	5,6	6	5,8	5,64	5,8
22	5,5	5,95	5,8	5,6	5,7
24	5,3	5,9	5,8	5,5	5,6

**Tableau VII:** Log des dénombrements dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul

jour	Fromage1	fromage 2	fromage 3
1	5,11	5,38	5,65
2	7,41	7,52	7,27
3	8,36	8,65	7,73
4	8,69	8,61	8,34
5	9,02	8,72	8,55
6	8,87	8,79	8,59
7	8,65	8,77	8,51
14	8,47	8,62	8,51
21	8,5	8,59	8,28

**Tableau VIII :** Log des dénombrements dans les fromages inoculés avec *S. aureus* et *Lc. lactis*

Jours	Fromage1	Fromage2	Fromage3	Fromage4
1	5,49	5,56	5,55	5,01
2	7,08	5,04	5,3	5,01
3	7,18	4,95	5,2	5,09
4	7,32	4,86	5,3	5,04
5	7,1	5,08	6,17	5
6	5,91	4,97	6,32	4,98
7	4,69	4,88	6,24	4,87
14	4,51	3,65	5,01	5,18
21	4,5	3,64	4,89	5,49

## Annexe IV

## Résultats des tests statistiques

**Tableau I :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
1<sup>er</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	0.00107	0.00107	0.0131
Vr	5	0.32507	0.08127	
Vt	6			

**Tableau II:** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
2<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	5,5081	5,5081	9,2627***
Vr	5	2,9733	0,5947	
Vt	6			

**Tableau III:** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
3<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	11,9630	11,9630	15,818***
Vr	5	3,7814	0,7563	
Vt	6			

**Tableau IV :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
4<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	14,5833	14,5833	18,352***
Vr	5	3,9733	0,7947	
Vt	6			

**Tableau V :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
5<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	12,5821	12,5821	20,647***
Vr	5	3,0469	06094	
Vt	6			

**Tableau VI:** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
6<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	17,6092	17,6092	61,774***
Vr	5	1,4253	0,2851	
Vt	6			

**Tableau VII:** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
7<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	20,6812	20,6812	65,312***
Vr	5	1,5833	0,3167	
Vt	6			

**Tableau VIII:** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
14<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	26,2864	26,2864	83.209***
Vr	5	1,5795	0,3159	
Vt	6			

**Tableau IX :** Analyse de la variance des résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages inoculés avec *S. aureus* seul et *S. aureus* et *Lc. lactis*  
21<sup>ème</sup> jour de stockage

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>
Vf	1	25,1029	25,1029	67,66***
Vr	5	1,8551	0,3710	
Vt	6			

## Abstract

The present study aims to highlight the ability of *Lc. Lactis* to inhibit a méticilline resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and to demonstrate the asset of this antagonism in raw milk cheese manufacture, by a simultaneous growth of both strains. Isolation and identification of *S. aureus* strains from different mastitis milks before, throughout and after antibiotic treatment was carried out, subsequently antibiotic susceptibility of isolated strains was determined by agar diffusion test. At the same time *Lc. Lactis* strains were isolated, purified and identified from different simples of raw milk, afterwards, they were screened for their inhibitory activity against antibiotic resistant *S. aureus* by agar spot test. Thereafter, *Lc. Lactis* antagonistic potential against antibiotic resistant *S. aureus* strains was investigated in a mixed culture of both strains in skim milk, then a fresh cheese (unripened) was manufactured, the cheese was subsequently inoculated with both strains, in order to follow the growth of *S. aureus* in cheese during storage at 4°C. 11 Strains of *S. aureus* were isolated from mastitis milk, all strains showed a resistance at least to one of the antibiotics tested, only one strain was methicillin resistant. Among 59 strains of lactic acid bacteria isolated, 14 were identified as *Lc. lactis* species, which 10 of whom showed a good antagonistic activity toward methicillin resistant *S. aureus*.

The follow-up study of *S. aureus* growth in mixed culture with *Lc. lactis* in milk and cheese showed that *S. aureus* was significantly inhibited in cheese in presence of *Lc. Lactis*.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; MRSA; Antagonism; *Lactococcus lactis*; raw milk cheese manufacture.

## المخلص

من خلال دراستنا قمنا بعزل سلالات *Staphylococcus aureus* من حليب التهاب الثدي قبل اثناء وبعد علاجهم بالمضادات الحيوية. بعد ذلك تمت انتيبيو غرامات للسلالات المعروفة للبحث على مقاومة ممكنة للمضادات الحيوية. وفي نفس الوقت تم عزل تنقية وتعرف سلالات *Lactococcus lactis* من مختلف عينات حليب طازج ففحصت تلك السلالات للتعرف مدى فعاليتها ضد *Staphylococcus aureus* المقاومة للمضادات الحيوية بطريقة السوتاج ثم تم إتباع فعاليتها *Lactococcus lactis* ضد *Staphylococcus aureus* في حليب منزوع القشدة فتم إنتاج جبن باستعمال هاتين البكتيريتين معا وهذا بهدف إتباع نمو *Staphylococcus aureus* في الجبن أثناء الحفظ في 4 م.

تم التعرف على 11 سلالة من *Staphylococcus aureus* عزلت من حليب التهاب الثدي. كل السلالات المتحصل عليها تتميز بمقاومة على الأقل إلى واحد من المضادات الحيوية المختبرة. سلالة واحدة فقط تميزت بمقاومة للميتيسلين *méthicilline*. من بين 59 سلالة من بكتريا الحليب المعزولة 14 منها عرفت وربطت إلى النوع *Lactococcus lactis* حيث 10 منها اتسمت بفعالية جيدة ضد *Staphylococcus aureus* المقاوم للمضادات الحيوية و اظهرت نتائج في الحليب وفي الجبن بين السلالتين *Staphylococcus aureus* و *Lactococcus lactis* انخفاض جد معتبر في نمو *Staphylococcus aureus* في حضور *Lactococcus lactis*.

الكلمات المفتاحية : *Staphylococcus aureus*; المقاومة للميتيسلين; *Lactococcus lactis*; فعالية ضد البكتريا; جبن بحليب طازج .

## Résumé

Cette étude avait pour objectif de mettre en évidence le pouvoir antagoniste de *Lactococcus lactis* à l'égard de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), et de démontrer l'intérêt de cet antagonisme dans la production de fromages au lait cru par une croissance simultanée des deux souches. Un isolement et une identification de souches de *S. aureus* à partir de différents laits de mammites avant pendant et après le traitement aux antibiotiques sont menés, par la suite des antibiogrammes des souches isolées et identifiées comme étant des *S. aureus* sont effectués afin de rechercher une éventuelle résistance aux antibiotiques. Parallèlement, des souches de *Lc. lactis* sont isolées, purifiées et identifiées à partir de différents échantillons de lait cru. Les souches de *Lc. lactis* sont alors criblées pour leur effet antibactérien, à l'égard de *S. aureus* résistant aux antibiotiques par le test des spots. Enfin, un suivi de l'activité antibactérienne potentielle de *Lc. lactis* à l'égard de *S. aureus* antibio-résistant est réalisé dans du lait écrémé. Un fromage frais est fabriqué après inoculation des deux espèces, afin de suivre l'évolution de la croissance de *S. aureus* dans le fromage lors du stockage à 4°C. 11 souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolées à partir de lait mammiteux, toutes les souches présentaient une résistance, au moins à un des antibiotiques testés, une seule souche s'est révélée résistante à la méthicilline. Sur 59 souches de bactéries lactiques isolées 14 ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis*, dont 10 présentaient une bonne activité antibactérienne à l'égard de *S. aureus* résistant aux antibiotiques. Les résultats du suivi de la croissance de *S. aureus* en culture mixte avec *Lc. lactis* dans le lait et le fromage, ont montré que la croissance de *S. aureus* est très significativement inhibée dans le fromage en présence de *Lc. lactis*.

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus*, SARM, antagonisme, *Lactococcus lactis*, fromage au lait cru