



**HAL**  
open science

**Etude du fonctionnement du système  
lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur  
vis-à-vis de flores du poisson :**

Ysabelle Adolphe

► **To cite this version:**

Ysabelle Adolphe. Etude du fonctionnement du système lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis de flores du poisson :. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL044N . tel-01752490

**HAL Id: tel-01752490**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752490>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE  
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire de Science et Génie Alimentaires

---

**THESE**

Présentée à l'INPL par

**Ysabelle ADOLPHE**

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

---

**Etude du fonctionnement du système lactoperoxydasique  
et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis de flores du poisson**

---

Soutenue publiquement le 6 octobre 2006 devant la commission d'examen

**Rapporteurs :**

M. Xavier Dousset, Professeur

M. Jean-François Cavin, Professeur

**Examineurs :**

Mme Françoise Leroi, Chargée de Recherches

Mme Anne-Marie Revol-Junelles, Maître de Conférences (directrice de thèse)

M. Jean-Bernard Millière, Professeur (co-directeur de thèse)

---

## Remerciements

Cette étude a été réalisée au Laboratoire Bioprocédés Agro-alimentaires et au Laboratoire de Science et Génie Alimentaires de l'ENSAIA-INPL de Nancy. Je remercie les Professeurs Michel Girardin et Stéphane Desobry pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires ainsi que pour les conseils et le soutien qu'ils m'ont prodigués.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Jean-Bernard Millière, Professeur à l'IUT Nancy-Brabois (UHP Nancy 1) et à Madame Anne-Marie Revol-Junelles, Maître de Conférence à l'ENSAIA, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je tiens à leur exprimer ma gratitude pour leur encadrement ainsi que pour avoir patiemment corrigé ce document.

Je tiens à remercier Monsieur Xavier Dousset, Professeur à l'ENITIAA de Nantes, Monsieur Jean-François Cavin, Professeur à l'ENSBANA de Dijon et à Madame Françoise Leroi, chargée de Recherches à l'IFREMER de Nantes, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également les personnes qui ont participé de près ou de loin à cette étude : M. Linder, M. Grasmuck, Mlle Turban, Mme Caillez-Grimal, M. Delaunay, Jitka, Hélène, Delphine, Muriel, Sophie.

J'adresse toute ma reconnaissance et toute mon amitié pour leur aide et leur soutien à Maxime, Manu, Fred et Ava, Christophe et Anne-Alex, Yoyo (Y team), Sylvia et Pierre, Isa, Vin's, Virg, Squalou, Asfaw, Didine, Medhi et Sophie, Momo, Irina, Romaric, JD, Lydia, Raoul, Djoul (et naturellement Benoît et Catherine), Fofie, Hanane, Nounours, Francky, Binouze, Garou et Plume, Romuald et Karine et la GNARF.

Pour finir, je tiens à remercier du plus profond du cœur toute ma famille pour tout : mes parents (jamaïcains dans l'âme), Yo et Stephy, Yann et Manu (et Mathys...), Yvan et Yolanda et sans oublier naturellement Gilbert et Pia.

Petite dédicace particulière aux Papys et Mamys de Marseille et de Maurice....

Un grand merci à toute l'équipe de l'IUT Génie Biologique de Colmar !

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>1</b>  |
| <hr/>   |           |
| <b>CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>                                       | <b>4</b>  |
| <hr/>   |           |
| <b>I. Le système lactoperoxydasique (LP-s)</b>                                  | <b>4</b>  |
| I.1. Les composants   | 4         |
| I.1.1. La lactoperoxydase   | 4         |
| I.1.2. La glucose oxydase   | 6         |
| I.1.3. Le thiocyanate   | 8         |
| I.1.4. Le peroxyde d'hydrogène  | 9         |
| I.2. Fonctionnement   | 10        |
| I.3. Activités antibactériennes   | 12        |
| I.4. Applications et utilisations   | 15        |
| <br>  |           |
| <b>II. La flore bactérienne indésirable du poisson</b>                          | <b>17</b> |
| II.1. Les altérations bactériologiques  | 17        |
| Pénétration des bactéries   | 17        |
| Dégradation du tissu musculaire   | 18        |
| II.2. Les principaux micro-organismes   | 20        |
| II.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> , flore pathogène                         | 21        |
| II.2.2. Flore d'altération  | 23        |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i>  | 23        |
| <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>  | 24        |
| <i>Shewanella putrefaciens</i>  | 25        |
| <br>  |           |
| <b>III. Le poisson</b>  | <b>27</b> |
| III.1. Le poisson modèle  | 27        |
| III.2. Les altérations intervenant après la mort du poisson                     | 27        |
| III.2.1. Les altérations autolytiques   | 28        |
| III.2.2. Les altérations physiques  | 29        |
| III.2.3. Les altérations organoleptiques  | 30        |
| III.3. Les techniques de conservation utilisées pour le poisson                 | 31        |
| III.3.1. Les agents physiques   | 31        |
| III.3.2. Les agents chimiques   | 32        |
| III.3.3. Les bio-conservateurs  | 33        |
| III.4. Les modèles d'études   | 34        |
| <br>  |           |
| <b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES</b>                                       | <b>36</b> |
| <hr/>   |           |
| <b>I. Souches bactériennes, milieux de culture et méthodes microbiologiques</b> | <b>36</b> |
| I.1. Souches bactériennes et conditions de culture                              | 36        |
| I.2. Milieux de culture   | 36        |
| I.3. Numérations bactériennes   | 37        |
| I.4. Etude physiologique des souches tests                                      | 38        |
| I.4.1. Galeries API   | 38        |
| I.4.2. Antibiogrammes   | 38        |
| I.4.3. Milieux sélectifs  | 39        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>II. Dosages chimiques et enzymatiques</b>  | <b>40</b> |
| II.1. Mesure de la valeur du pH   | 40        |
| II.2. Dosage du thiocyanate   | 40        |
| II.2.1. Dans un bouillon  | 41        |
| II.2.2. Dans le poisson   | 41        |
| II.3. Dosage du peroxyde d'hydrogène  | 42        |
| II.4. Dosage du glucose   | 43        |
| II.5. Dosage de l'activité lactoperoxydasique   | 44        |
| II.6. Dosage de l'activité glucose oxydasique   | 45        |
| II.7. Indice de peroxydes   | 46        |
| II.8. Mesures de la concentration en oxygène dissous et du potentiel d'oxydo-réduction  | 47        |
| II.9. Dosage des acides gras  | 47        |
| <b>III. Les plans d'expériences</b>   | <b>49</b> |
| III.1. Réseaux uniformes de Doehlert  | 49        |
| III.2. Conditions opératoires   | 50        |
| III.3. Modélisation de la réponse   | 51        |
| III.4. Etude des surfaces de réponses   | 52        |
| <b>IV. Impact du LP-s sur la croissance bactérienne</b>   | <b>53</b> |
| IV.1. Comparaison de l'effet antibactérien du LP-s optimisé et du LP-s anciennement utilisé au laboratoire  | 53        |
| IV.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)   | 54        |
| IV.3. Impact du LP-s sur la croissance bactérienne  | 55        |
| IV.3.1. Etude en milieu TSB-YE  | 55        |
| IV.3.2. Etude sur milieu modèle "poisson"   | 55        |
| <b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION</b>   | <b>56</b> |
| <b>I. Etude physiologique des souches tests</b>   | <b>56</b> |
| I.1. Caractéristiques physiologiques  | 56        |
| I.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques  | 59        |
| I.3. Validation de milieux sélectifs  | 61        |
| <b>II. Etude du fonctionnement du LP-s</b>  | <b>63</b> |
| II.1. Activités enzymatiques de la glucose oxydase et de la lactoperoxydase   | 64        |
| II.2. Impact de la GOD, de la LPO, du glucose et de la valeur du pH sur la peroxydation du thiocyanate  | 65        |
| II.2.1. Analyses de la peroxydation du thiocyanate  | 65        |
| II.2.2. Quantification de l'impact des différents facteurs  | 66        |
| II.3. Détermination des conditions optimales du fonctionnement du LP-s  | 71        |
| II.4. Comparaison de l'impact du LP-s optimisé, LP-sO, et du LP-s utilisé préalablement au laboratoire, LP-sN, sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> CIP 82110 <sup>T</sup> et <i>P. fluorescens</i> CIP 6913 <sup>T</sup> | 74        |
| II.5. Effet de l'oxygène dissous sur le fonctionnement du LP-s optimisé   | 77        |
| II.6. Evolution des différents constituants du LP-s en milieu TSB-YE  | 81        |
| <b>III. Impact du LP-s sur la croissance bactérienne</b>  | <b>84</b> |
| III.1. Etude en milieu TSB-YE   | 84        |
| III.1.1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)  | 84        |
| III.1.2. Impact du LP-s sur la croissance des souches à 4 °C  | 90        |
| <i>Listeria monocytogenes</i> DSM 20600 <sup>T</sup>  | 91        |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171 <sup>T</sup>   | 94        |
| <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM 20730 <sup>T</sup>   | 98        |

---

|  |            |
|--|------------|
| <i>Shewanella putrefaciens</i> CIP 80.40 <sup>T</sup>                                    | 101        |
| Etude de la croissance des souches en culture mixte                                      | 106        |
| III.2. Etude sur milieu modèle   | 110        |
| III.2.1. Mise au point du milieu   | 111        |
| III.2.2. Dosage du thiocyanate ajouté dans le poisson                                    | 112        |
| III.2.3. Fonctionnement du système lactoperoxydasique                                    | 114        |
| III.2.4. Comparaison de la croissance des souches sur milieu TSB-YE et sur milieu modèle | 116        |
| III.2.5. Impact du LP-s optimisé sur la croissance des souches à 4 °C                    | 119        |
| <i>Listeria monocytogenes</i> DSM 20600 <sup>T</sup>                                     | 119        |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171 <sup>T</sup>                                  | 121        |
| <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM 20730 <sup>T</sup>                              | 123        |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> CIP 80.40 <sup>T</sup>                                    | 124        |
| Etude de la croissance des souches en culture mixte                                      | 127        |
| III.2.6. Impact du LP-s et du comportement des souches sur la composition lipidique      | 129        |
| <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>   | <b>132</b> |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>   | <b>138</b> |

---

## ANNEXE I

## ANNEXE II

## Introduction

La présence de microflore d'altération ou de micro-organismes pathogènes reste encore un souci majeur dans le domaine alimentaire. La conservation des aliments utilise un large panel d'opérations unitaires faisant appel à des méthodes physiques, telles que la pasteurisation, la congélation, le stockage en atmosphère contrôlée, l'ionisation ou la réduction de l' $a_w$ , chimiques, telles que l'addition de nitrites ou de sulfites, et biologiques. Cependant, ces procédés modifient parfois défavorablement les propriétés fonctionnelles et/ou organoleptiques des produits. Une nouvelle génération d'aliments a émergé, souvent conservés sous-vide ou en atmosphère modifiée (Chen et Hotchkiss, 1993) ou en réfrigération et ne contenant qu'une très faible concentration de conservateurs, mais présentant de ce fait un risque potentiel de contamination par des flores psychrotrophes d'altération ou pathogènes.

Le système lactoperoxydasique (LP-s) est composé de la lactoperoxydase (LPO, EC 1.11.1.7) et de ses deux substrats, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le thiocyanate ( $SCN^-$ ). La LPO catalyse la peroxydation du  $SCN^-$  en présence d' $H_2O_2$ , soit apporté de manière endogène (Korhonen et Reiter, 1983) soit produit par le système glucose oxydase (GOD, EC 1.1.3.4)/glucose. Cette réaction génère des produits réactifs possédant un large spectre antibactérien (Aune et Thomas, 1977 ; Reiter et Härnultv, 1984 ; Reiter, 1985 ; Reiter et Perraudin, 1991).

Le LP-s est naturellement présent dans le lait cru et en est l'un des principaux générateurs d'agents antibactériens (Björk, 1978 ; Reiter et Härnultv, 1984 ; Reiter, 1985 ; de Witt et van Hooijdonk, 1996 ; Haddadin *et al.*, 1996). Grâce à la FAO (Food Agricultural Organization ; Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture), à l'OMS (l'Organisation Mondiale de la Santé), au *Codex alimentarius*, à la FIL (Fédération Internationale de Laiterie), des recherches ont été menées dans le but d'utiliser le LP-s, moyen peu coûteux, pour aider à la conservation du lait cru dans les pays en voie de développement.

De nombreux travaux ont étudié les applications potentielles dans divers domaines du LP-s. En aquaculture, ce bio-conservateur permet de réduire la mortalité d'environ 30 % lors du sevrage des jeunes poissons (Van Hooijdonk *et al.*, 2000) et de lutter efficacement contre les infections du pou de mer (Kussendrager et van Hooijdonk, 2000). Plusieurs études ont



démontré l'effet conservateur du LP-s sur la viande, et dans le cas de l'Australie, cela a conduit à une autorisation de son utilisation pour la conservation de la viande au cours de son importation et son exportation (Kennedy *et al.*, 2000 ; McLay *et al.*, 2002 ; Elliot *et al.*, 2004). Depuis 2003 par autorisation de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), le LP-s peut être utilisé en tant qu'auxiliaire technologique pour le traitement des salades de la IV<sup>ème</sup> gamme.

En 1991, suite à de nombreuses études permettant l'utilisation légale du système LPO/GOD/glucose/SCN<sup>-</sup>, ce dernier a été classé par le *Codex alimentarius* dans la catégorie des agents de lutte contre les micro-organismes (CAC/GL 13-1991).

Cette étude a pour objectif d'étudier le fonctionnement du LP-s afin d'en améliorer l'effet antibactérien et de valider l'effet inhibiteur sur la croissance de différentes souches en milieu de laboratoire et dans un aliment. A terme, l'objectif est de maîtriser les flores d'altération et les flores pathogènes afin d'assurer la qualité et la sécurité des aliments.

Les valeurs des différentes concentrations de chacun des composés du LP-s, retrouvées dans la littérature, rendent difficiles le choix du LP-s "type" et indispensable une étude approfondie du fonctionnement de ce système. L'utilisation de plans d'expériences, par l'utilisation des réseaux uniformes de Doehlert, servira à comprendre le fonctionnement global du système, de mettre en évidence les interactions qui peuvent intervenir au sein du système complet et d'optimiser les concentrations des différents constituants du LP-s afin d'obtenir une peroxydation maximale du SCN<sup>-</sup>. L'O<sub>2</sub> est l'un des substrats du système GOD/glucose, mais sa concentration optimale pour l'efficacité maximale du LP-s n'a jamais été déterminée ; l'impact de sa teneur sur la peroxydation du thiocyanate sera mesuré.

Le poisson est une des denrées alimentaires la plus périssable. Son altération, phénomène qui apparaît dès les premières heures qui suivent sa capture, est liée à ses caractéristiques biochimiques et à sa microflore spécifique. Cette flore très complexe est composée d'espèces pathogènes et d'altération. *Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène majeure par l'importance de sa fréquence dans les maladies ayant pour origine un produit issu de la pêche et/ou par la virulence de la souche. Trois souches, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Shewanella putrefaciens* représentent les espèces caractéristiques de différents niveaux de l'altération du poisson. L'efficacité du LP-s sera

testée vis-à-vis de ces quatre espèces, en cultures pures et en culture mixte, en milieu de laboratoire et dans un milieu modèle à base de filets de truites arc-en-ciel issues d'aquaculture continentale. L'altération de la chair du poisson sera mesurée par l'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Ce travail a fait l'objet de :

***Publication dans une revue internationale***

**Y. Adolphe, M. Jacquot, M. Linder, A.-M. Revol-Junelles, J.-B. Millière.** Optimisation of the combination of the inhibitory potentiality of glucose oxidase and lactoperoxidase systems by Response Surface Methodology approach. *Journal of Applied Microbiology*, mai 2006. 100 (5) : 1034-42.

***Communication écrite avec acte***

**Y. Adolphe, A.-M. Revol-Junelles, J.-B. Millière.** Effet inhibiteur du LP-s sur la croissance de *Shewanella putrefaciens*. Séminaire de l'Ecole Doctorale, 2005 (Nancy).

***Communication écrite***

**Y. Adolphe, M. Linder, A.-M. Revol-Junelles, J.-B. Millière.** Inhibitory activity of LP-s on *Listeria monocytogenes*. VI<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), 10-12 mai 2004 (Bordeaux).

# Chapitre 1 : Revue bibliographique

## I. Le système lactoperoxydasique (LP-s)

### I.1. Les composants

#### I.1.1. La lactoperoxydase

Les peroxydases sont des enzymes à noyau hème qui utilisent le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électron pour catalyser des réactions d'oxydation (O'Brien, 2000). Les peroxydases sont présentes chez les bactéries, les moisissures, les levures, les plantes et les animaux. Elles peuvent être classées selon des critères structuraux. Les principales peroxydases sont la myéloperoxydase, la peroxydase éosinophile, la lactoperoxydase (LPO), la peroxydase thyroïdienne et la prostaglandine H synthase.

La lactoperoxydase (LPO, EC : 1.11.1.7) est, après la xanthine oxydase, l'oxydase la plus abondante dans le lait de vache. Présente à des concentrations de l'ordre de 10 à 30 mg.l<sup>-1</sup>, elle constitue environ 1 % des protéines du lactosérum (Reiter, 1985). C'est une glycoprotéine cationique de 78,5 kDa formée d'une chaîne polypeptidique de 612 acides aminés, comportant 10 % de groupements carboxyles (Dull *et al.*, 1990 ; Kussendrager, 1994). Son point isoélectrique est égal à 9 (Marcozzi *et al.*, 1998). Environ 12 % de sa structure est non organisée, 23 % organisée en hélice  $\alpha$  et 65 % en hélice  $\beta$ .

Le groupement hème représente le centre catalytique de la molécule. Un ion Ca<sup>2+</sup> est lié à la molécule et semble avoir une importance dans la stabilité de la conformation de l'enzyme. Le résidu histidine, présent au centre de la molécule, sert de lien avec l'atome de fer du noyau et participe au transfert d'électrons lors des réactions avec l'ion thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) et l'ion iodure (I<sup>-</sup>) (de Witt et van Hooydonk, 1996).

La lactoperoxydase est l'une des enzymes du lait la plus thermorésistante (Griffiths, 1986). Sa dénaturation est possible à des températures supérieures à 73 °C (de Witt et van Hooydonk, 1996). Une pasteurisation de 2 s à 72 °C en tampon acétate provoque une perte d'activité de 34 % ; une perte totale d'activité est observée lorsque le temps de chauffage à 72 °C dure 2 min. Dans le lait cru, dans les mêmes conditions de chauffage de 2 s et 2 min à 72 °C, une perte d'activité de respectivement seulement 2 et 15 % est enregistrée et une dénaturation

totale est obtenue pour un chauffage à 76 °C durant 2 min (de Witt et van Hooydonk, 1996). Elle est totalement inactivée après un traitement du lait cru à 80 °C – 15 s (Barrett *et al.*, 1999). La thermorésistance de la lactoperoxydase dans du tampon à pH 6,4 peut être restaurée par l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  ; les mêmes résultats que ceux observés dans le lait cru sont alors obtenus, confirmant ainsi la contribution des cations bivalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans l'intégrité structurale de l'enzyme (Kussendrager et van Hooijdonk, 2000). La force ionique joue un rôle majeur dans la stabilité thermique de la lactoperoxydase. Alors que l'augmentation excessive de la température est connue pour altérer les interactions hydrophobes, l'augmentation de la force ionique conduit à une stabilisation de ces interactions qui sont primordiales dans la stabilité conformationnelle de ces protéines (Creighton, 1984).

L'activité optimale de la lactoperoxydase est observée à des valeurs de pH comprises entre 5,0 et 6,5 (Reiter *et al.*, 1976 ; Wever *et al.*, 1982 ; Hernandez *et al.*, 1990). En présence de NaCl, le pH optimum se situe entre 3,4 et 5,0 (Sanchez, 1990). La présence de sel provoquerait une variation du degré d'ionisation du substrat et du site actif permettant une meilleure formation du complexe enzyme/substrat (Dixon et Webb, 1964).

La lactoperoxydase peut être dénaturée par le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Son activité diminue avec l'augmentation de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  ; un optimum d'activité est observé à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,2 mM. Des concentrations supérieures à 1 mM inhibent son activité (Hernandez *et al.*, 1990).

La peroxydation du  $\text{SCN}^-$  par la lactoperoxydase est réalisée suivant 3 cycles différents qui dépendent des concentrations en  $\text{SCN}^-$  et en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 1, Tableau 1). Lorsque la concentration en  $\text{SCN}^-$  est suffisante, la réaction a lieu avec transfert de deux électrons et production du composé I, correspondant à une activation optimale de la lactoperoxydase. Lorsque la concentration en  $\text{SCN}^-$  est insuffisante (inférieure à 0,3  $\mu\text{M}$ ), la réaction a lieu avec transfert d'un seul électron et accumulation du composé II et inactivation réversible de l'enzyme. Lorsque l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est en excès (supérieur à 0,5 mM), un composé III se forme et réagit avec le composé II ; l'enzyme est inactivée de manière irréversible (Kohler et Jenzer, 1989 ; Jantschko *et al.*, 2005).

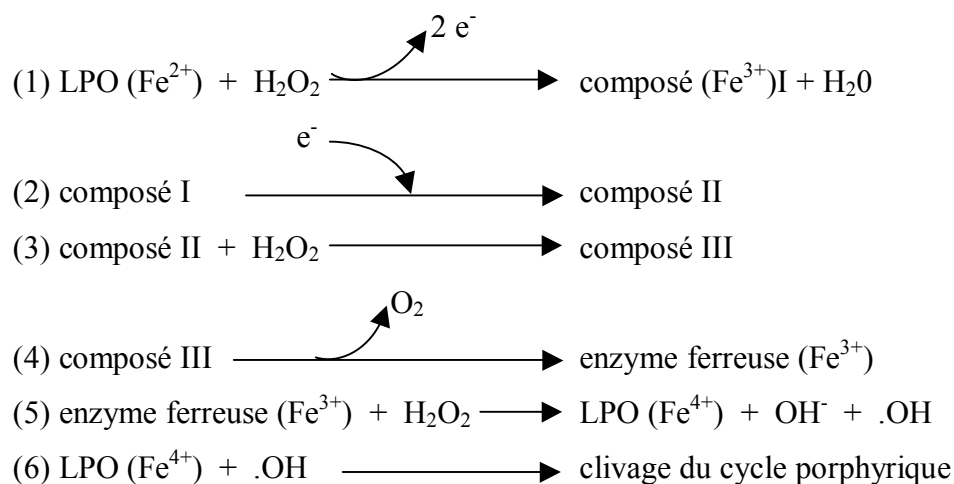


Figure 1 : Réactions d'inactivation de la lactoperoxydase en présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène (Kohler et Jenzer, 1989 ; Jantschko *et al.*, 2005)

| Réactions | Conditions                                       | Conséquences                        |
|-----------|--|-------------------------------------|
| 1         | [SCN <sup>-</sup> ] suffisante                   | Activation optimale                 |
| 2         | [SCN <sup>-</sup> ] < 0,3 μM                     | Inactivation réversible de la LPO   |
| 3 à 6     | Excès d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (> 0,5 mM) | Inactivation irréversible de la LPO |

Tableau 1 : Conséquences des concentrations initiales des substrats sur l'activation de la LPO

Le substrat privilégié de la lactoperoxydase est l'ion thiocyanate. Cette enzyme peut également oxyder d'autres halogénures tels que l'ion bromure (Br<sup>-</sup>), l'ion chlorure (Cl<sup>-</sup>) ou l'ion iodure (I<sup>-</sup>) (Revol-Junelles *et al.*, 2001 ; Cailliez-Grimal *et al.*, 2002). Carlsson (1983) a déterminé les vitesses de réaction en présence des différents substrats par un suivi de la disparition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est beaucoup plus rapide en présence de I<sup>-</sup> que de Br<sup>-</sup>. Le pH optimum en présence de SCN<sup>-</sup> ou de Br<sup>-</sup> est de 4,5 et de 6,8 en présence de I<sup>-</sup> (Ferrari *et al.*, 1995).

### I.1.2. La glucose oxydase

La glucose oxydase (β-D glucose oxygène 1-oxydoréductase, GOD) appartient à la famille des oxydo-réductases (EC.1.1.3.4). C'est une flavoprotéine homodimérique glycosylée (*Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*) ou non glycosylée (*Phanerochaete chrysosporium*). La glucose oxydase d'*Aspergillus niger* a une masse molaire de 160 kDa et contient 16 % de groupements carboxyles (Haouz *et al.*, 2001). Cette protéine acide a un point isoélectrique de 4,2 (Swoboda et Massey, 1965). Chaque monomère est constitué de 583 acides aminés et

possède un pont disulfure qui participe probablement à l'activité enzymatique. Il contient une mole de fer et une mole de FAD (Frederick *et al.*, 1990 ; Wolfson et Sumner, 1993). L'enzyme est active sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7, avec un optimum à pH 5,5 (Haouz *et al.*, 2001).

La GOD catalyse l'oxydation du D-glucose en présence d'oxygène en  $\delta$ -gluconolactone secondairement transformée en acide gluconique. Cette réaction s'accompagne de la libération d' $H_2O_2$  (Figure 2).

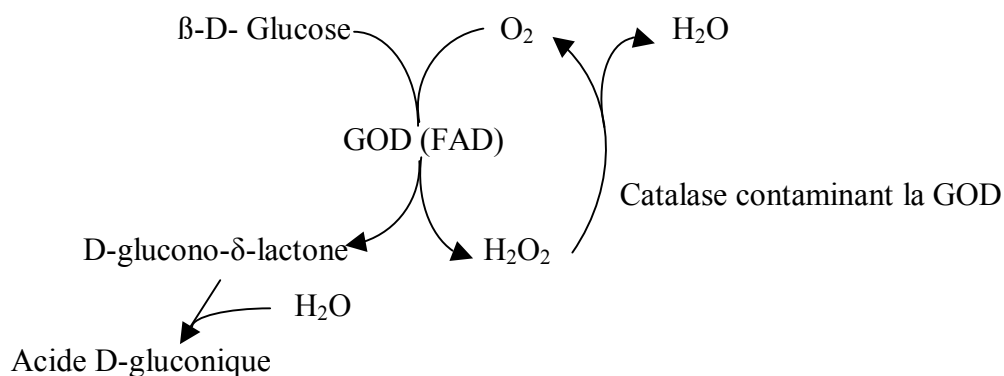


Figure 2 : Réaction d'oxydation du glucose en présence d'oxygène catalysée par la GOD (Wolfson et Sumner, 1993 ; Haouz, 1994)

La GOD possède une activité catalasique contaminante qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en molécules d'eau et d'oxygène. La réaction prédominante entre la décomposition du peroxyde d'hydrogène et l'oxydation du donneur de proton dépend de la concentration en donneur (Reiter *et al.*, 1964 ; Wolfson et Sumner, 1993).

La catalase est une protéine tétramérique ayant un poids moléculaire de 240 kDa. Chaque sous-unité a un noyau protohème qui contient un atome de fer. Son pH optimum d'activité se situe entre 6 et 7,5 (Bermeyer, 1983). La catalase couplée à la GOD est utilisée en industrie alimentaire pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène résiduel.

En solution, la GOD perd rapidement son activité entre 30 et 40 °C pour être totalement inactive à 50 °C ; une partie de l'activité est retrouvée si l'enzyme est placée à température ambiante. Cette activité résiduelle diminue lorsque la température augmente et disparaît à 70 °C. La dénaturation est réversible lorsque l'augmentation de température n'entraîne que des modifications conformationnelles ; elle est irréversible lorsque les modifications sont

chimiques. Les deux états sont liés car le taux de modification chimique dépend du débobinage de la protéine (Mitsuhiko *et al.*, 1999).

La dénaturation thermique de la GOD est en relation avec le pH de la solution. Plus l'enzyme est active, plus sa dénaturation thermique est faible. C'est donc au pH optimum de l'enzyme que la dénaturation sera la plus faible (Haouz, 1994).

L'immobilisation de l'enzyme est souvent employée pour améliorer la thermotolérance de la GOD. Malheureusement, des problèmes d'inhibition par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> existent et freinent le développement économique de ces études (Pitcher, 1980).

La principale application de la GOD est son utilisation en tant que biocapteur, associée ou non à une peroxydase, afin de mesurer le taux de glucose ou le taux d'oxygène. En effet, la GOD fut la première enzyme à être immobilisée dans les années 60 (Haouz, 1994).

Certaines recherches du laboratoire ont permis de créer des microbilles sèches actives par encapsulation du système complet et présentant une activité antibactérienne contre huit souches, dont *Listeria monocytogenes*. Cette technique d'immobilisation présente des intérêts en agroalimentaire, en cosmétique ou encore en chimie (Jacquot *et al.*, 2002).

La GOD est aussi appréciée pour sa capacité à réduire le taux d'oxygène ou de glucose dans les aliments ou les boissons. Cette consommation d'oxygène présent dans les aliments permet d'empêcher le changement de couleur, d'arôme et de goût de ces derniers pendant la transformation, le transport ou le stockage (Wiseman, 1987 ; Rando *et al.*, 1997). Elle peut être utilisée pour augmenter le temps de conservation de certaines denrées. Par exemple, la GOD peut être utilisée pour prolonger le temps de conservation des crevettes entre 0 et 2 °C (Dondero *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que l'utilisation du système GOD/glucose pouvait allonger la durée de conservation du poisson de 67 % (Field *et al.*, 1986).

### I.1.3. Le thiocyanate

Comme la LPO, le thiocyanate est naturellement présent dans les tissus et les sécrétions des mammifères (lait, salive, sécrétions thyroïdiennes). Dans le lait, les concentrations en thiocyanate varient selon le type d'animal (4,5 ppm pour la chèvre et jusqu'à 10 mg.kg<sup>-1</sup> pour

la vache), son alimentation et la période de lactation (Weuffen *et al.*, 1982 ; Zapico *et al.*, 1991). Les deux sources majeures de thiocyanate sont les glucosinolates et les glucosides cyanogéniques. Les plantes du genre *Brassica* (famille des crucifères) telles que le chou, les céréales, comme le maïs, ou encore les pommes de terre en sont particulièrement riches (Wolfson et Sumner, 1993).

Des essais ont été réalisés pour augmenter la teneur en thiocyanate du lait de vache en enrichissant leur alimentation en végétaux riches en précurseurs de thiocyanate (Bibi et Bachmann, 1997). Malheureusement, l'excès de thiocyanate est éliminé dans les urines. Il apparaît donc que les taux de thiocyanate dans les sécrétions sont dépendants de l'alimentation mais aussi des capacités d'élimination de l'animal qui vont contrôler ce taux.

#### I.1.4. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un agent stérilisant, fortement toxique. Il est capable d'inactiver les enzymes par oxydation d'acides aminés tels que des résidus tryptophane, tyrosine, histidine, méthionine et cystéine (Neumann, 1967). L'inconvénient majeur de son utilisation dans les aliments est dû au fait qu'il est à l'origine d'altérations, de flaveurs oxydées et de phénomènes de blanchiment. Dans le lait, il peut être naturellement produit, sous l'action d'oxydases, par les leucocytes polymorphonucléaires. Ces derniers génèrent de l' $H_2O_2$  jusqu'à une concentration de 60  $\mu M$  par million de polymorphonucléaires. Il peut également être produit par le biais d'enzymes de type flavo-oxydases qui utilisent l'oxygène moléculaire avec transfert de deux électrons. Ce type d'enzyme existe dans le lait, la xanthine oxydase étant la plus abondante (20  $mg.l^{-1}$ ). Cette enzyme est peu spécifique vis-à-vis de ces substrats qui peuvent être l'hypoxanthine mais aussi de nombreux aldéhydes. Son activité est augmentée par la réfrigération qui libère l'enzyme des globules gras sur lesquels elle est liée. Après la traite, elle produit dans le lait du peroxyde d'hydrogène.

Les bactéries lactiques (catalase négative) peuvent également produire du peroxyde d'hydrogène, dans des conditions aérobies, jusqu'à 140  $\mu M$  (Juven et Pierson, 1996). La sélection de bactéries lactiques pour l'industrie laitière a permis de mettre en évidence des souches fortement productrices qui accumulent du peroxyde d'hydrogène pendant les 12 premières heures d'incubation. Une diminution des concentrations en peroxyde est tout de même observée lorsque les cultures vieillissent.



La Fédération Internationale de Laiterie (FIL/IDH, 1988) recommande l'activation du système LP pour la préservation du lait sous certaines conditions climatologiques ou technologiques, par production du peroxyde d'hydrogène lors de la dissolution du percarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}_2$ ). Le peroxyde d'hydrogène peut se conserver à l'état solide soit sous forme de peroxyde d'urée, soit sous forme de peroxydes métalliques tels que les peroxydes de sodium, de magnésium ou de calcium. L'activation de la lactoperoxydase au moyen de ces substances a d'ailleurs été préconisée par Björk *et al.* (1979). L'inconvénient majeur de ces peroxydes métalliques est que même conservés solides sous atmosphère inerte, ils libèrent des concentrations de peroxyde d'hydrogène qui inactivent la LPO. Il est donc primordial de parvenir à libérer le peroxyde d'hydrogène à un flux faible et constant tout en le maintenant à un seuil de concentration tel que l'enzyme puisse produire l'anion hypothiocyanite en concentrations suffisantes. Une alternative intéressante à l'ajout de peroxyde d'hydrogène consiste en l'utilisation d'un système enzymatique générateur d' $\text{H}_2\text{O}_2$  de type glucose-oxydase/glucose (Wolfson et Sumner, 1993).

La première utilisation d'un générateur enzymatique remonte aux années 85–90. L'intérêt de l'utilisation d'un système enzymatique, plutôt que l'ajout direct d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , repose sur la libération progressive du peroxyde, ce qui permet le maintien de l'activité lactoperoxydasique dans le temps (Shandholm *et al.*, 1988).

## I.2. Fonctionnement

Les premières hypothèses sur le mode d'action du système ont été émises après la mise en évidence du pouvoir antibactérien de l'hypothiocyanite. L'activité du LP-s a été testée sur des cellules d'*Escherichia coli* sauvages et des cellules dont la membrane était altérée par action de l'EDTA ou par un choc osmotique. L'altération de la membrane favorisant l'action du système, la localisation du site d'action de  $\text{OSCN}^-$  a été supposée être au niveau de la membrane plasmique (Thomas et Aune, 1978a).

Les études suivantes ont montré que le système LP agit par le biais de dommages membranaires et par l'inhibition d'enzymes cytoplasmiques. Ces dommages sont dus à la fixation de l'hypothiocyanite aux groupements SH libres des protéines membranaires et des enzymes clés du métabolisme (Figure 3). La fixation de l' $\text{OSCN}^-$  entraîne une modification du gradient de pH et une fuite d'ions potassium et d'acides aminés. Il en résulte une perturbation

des activités cellulaires faisant intervenir des protéines, une inhibition de la chaîne respiratoire et un dérèglement de la synthèse d'ADN et d'ARN (Reiter et Härnultv, 1984 ; Reiter et Perraudin, 1991 ; Hui, 1993 ; Kussendrager et van Hooijdonk, 2000).

Les effets du système sur le métabolisme bactérien incluent la réduction de la prise d'oxygène (Oram et Reiter, 1966), la réduction de la production du lactate par les micro-organismes fermentants (Tenovuo *et al.*, 1981), l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme telles que l'hexokinase et la glycéraldéhyde-3P-déshydrogénase (Marshall et Reiter, 1980 ; Adamson et Pruitt, 1981 ; Law et John, 1981), l'inhibition de la prise de glucose (Mickelson, 1977), l'altération de la membrane cytoplasmique avec libération d'ions potassium, d'acides aminés et de polypeptides (Marshall et Reiter, 1980 ; Law et John, 1981) et l'inhibition de la synthèse protéique (Mickelson, 1977 ; Reiter, 1978).

Certaines observations montrent l'inhibition du transport des acides aminés chez *Lactobacillus acidophilus* (Clem et Klebanoff, 1966 ; Slowey *et al.*, 1968) et chez *Streptococcus mitis* (Hamon et Klebanoff, 1973) et du transport du glucose chez *Streptococcus agalactiae* (Mickelson, 1977).

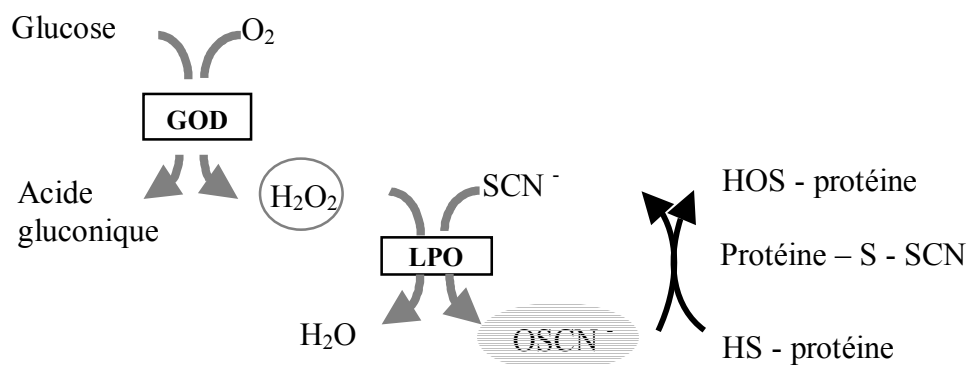


Figure 3 : Mode d'action du système lactoperoxydasique complet (Thomas et Aune, 1978b)

Les produits finaux de l'oxydation du thiocyanate par la LPO dépendent de la méthode utilisée pour produire le peroxyde hydrogène ainsi que de la proportion relative en substrats (Dionysius *et al.*, 1992). Lorsque l' $H_2O_2$  est formé par le système enzymatique, le rapport stoechiométrique  $H_2O_2/SCN^-$  assure que l' $OSCN^-$  est le principal produit d'oxydation formé, l' $O_3SCN^-$  ainsi que d'autres oxyanions sont aussi formés.

Aujourd'hui, le mécanisme d'action exact du système n'est toujours pas parfaitement élucidé, son efficacité dépendant de la concentration de substances antibactériennes produites, des substrats employés et du mode de génération du peroxyde d'hydrogène.

### I.3. Activités antibactériennes

En plus de l'activité antibactérienne, l'activité inhibitrice du LP-s a été rapportée contre les virus (Belding *et al.*, 1970), les mycoplasmes (Reiter *et al.*, 1981), les parasites (Nogueria *et al.*, 1982) ainsi que contre certaines levures et moisissures (Popper et Knorr, 1997 ; Cailliez-Grimal *et al.*, 2002).

Il semble que la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives soit un obstacle plus grand à l'action de l'ion hypothiocyanite que ne l'est la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives. Les résultats sont variables selon le système de production de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et selon les différentes conditions expérimentales (milieu de culture, température d'incubation, pH,...).

Les activités inhibitrices des différents systèmes lactoperoxydasiques avec un apport initial d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sont énumérées dans le Tableau 2. Les différents LP-s de la littérature utilisant une production progressive d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par le système glucose/GOD, sont détaillés dans le Tableau 3. L'efficacité antibactérienne, bactériostatique ou bactériolytique, dépend des conditions expérimentales comme le montrent Marshall et Reiter (1980), Dionysius *et al.* (1992), Bosch *et al.* (2000), Garcia-Graells *et al.* (2000), Kennedy *et al.* (2000), Revol-Junelles *et al.* (2001), McLay *et al.* (2002) et Dufour *et al.* (2003) pour *Escherichia coli* ; Denis et Ramet (1989), Bibi et Bachmann (1990), Rodriguez *et al.* (1997), Boussouel *et al.* (2000), Garcia-Graells *et al.* (2000), Kennedy *et al.* (2000), Revol-Junelles *et al.* (2001) et Dufour *et al.* (2003) pour *Listeria monocytogenes* ; Bosch *et al.* (2000) et Dufour *et al.* (2003) pour *Pseudomonas aeruginosa* ; Bosch *et al.* (2000), Kennedy *et al.* (2000) et McLay *et al.* (2002) pour *Staphylococcus aureus* ; Jago et Morrison (1962) et Mickelson (1966) pour *Streptococcus pyogenes*.

L'analyse des différentes conditions expérimentales montre que ces différents systèmes sont difficilement comparables entre eux. De plus certaines données manquent de précisions, comme certaines activités enzymatiques, ce qui rend plus difficile l'analyse comparative. Par ailleurs, le panel de concentrations des substrats est très large et les rapports enzyme/substrat sont disproportionnés. Une comparaison des études réalisées au sein du laboratoire

(Boussouel *et al.*, 2000 ; Revol-Junelles *et al.*, 2001) avec les autres données de la littérature montre que les concentrations de LPO utilisées varient du simple au triple, de 5000 UI.l<sup>-1</sup> pour Boussouel (2000) à 14000 UI.l<sup>-1</sup> pour Dionysius *et al.* (1992). Les concentrations de GOD employées sont réparties également sur une gamme très large, de 42 UI.l<sup>-1</sup> (Revol-Junelles *et al.*, 2001) à 984 UI.l<sup>-1</sup> (Kennedy *et al.*, 2000). Il en est de même pour le glucose et le SCN<sup>-</sup>, dont les concentrations sont comprises respectivement entre 0,013 (Dufour *et al.*, 2003) et 19,59 mg.l<sup>-1</sup> (Bosch *et al.*, 2000), et entre 2,24 (Dionysius *et al.*, 1992) et 500 mg.l<sup>-1</sup> (McLay *et al.*, 2002). La gamme des valeurs de pH est proche de la neutralité, de 5,0 (Bosch *et al.*, 2000) à 7,8 (Kennedy *et al.*, 2000 ; McLay *et al.*, 2002 ; Dufour *et al.*, 2003). De ce fait, les effets antibactériens obtenus sont eux-mêmes difficilement comparables.

| Auteurs                                | Souches  | Effet antibactérien                     |
|--|--|---|
| Jago et Morrison, 1962                 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ,<br><i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> | bactériostatique                        |
| Mickelson, 1966                        | <i>Streptococcus agalactiae</i><br><i>Streptococcus pyogenes</i>   | bactériostatique<br>bactériolytique     |
| Björk, 1978                            | Flore du lait cru  | bactériostatique<br>bactériolytique     |
| Marshall et Reiter, 1980               | <i>Escherichia coli</i><br><i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>  | bactériolytique<br>bactériostatique     |
| Bibi et Bachmann, 1990                 | <i>Listeria</i> sp.  | bactériostatique                        |
| Haddadin <i>et al.</i> , 1996          | Flore du lait cru  | bactériostatique<br>bactériolytique     |
| Rodriguez <i>et al.</i> , 1997 *       | <i>Listeria monocytogenes</i>  | bactériolytique                         |
| Garcia-Graells <i>et al.</i> , 2000 ** | <i>Listeria innocua</i> , <i>Escherichia coli</i>  | bactériostatique                        |
| Benoy <i>et al.</i> , 2000             | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> ,<br><i>Candida albicans</i>  | Zone d'inhibition sur gélose importante |

Tableau 2 : Comparaison de l'activité inhibitrice des différents systèmes LPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/SCN<sup>-</sup> utilisés dans la littérature

\* : utilisation de bactériocine en association avec le système lactoperoxydasique, \*\* : utilisation d'une haute pression en association avec le système lactoperoxydasique

| Références                                    | [GOD]   | [LPO]   | [Glucose]<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | [SCN <sup>-</sup> ]<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | pH           | Milieux                            | Températures<br>(°C) | Souches   | Effet<br>antibactérien                         |
|---|---|---|-----------------------------------|--|--------------|------------------------------------|----------------------|---|--|
| Denis et Ramet,<br>1989                       | 2 mg.l <sup>-1</sup><br>(282 UI.l <sup>-1</sup> ) | 20 mg.l <sup>-1</sup><br>(8000 UI.l <sup>-1</sup> ) | 2,60                              | 25   | 6,6          | lait                               | 4 et 15              | <i>L. monocytogenes</i>   | bactériolytique                                |
| Dionysius <i>et al.</i> ,<br>1992             | 100 UI.l <sup>-1</sup>                            | 14000 UI.l <sup>-1</sup>                            | 3,12                              | 2,24<br>ou 224                               | NP           | peptone-<br>extrait de levure      | 37                   | <i>E. coli</i>  | bactériostatique                               |
| Kennedy <i>et al.</i> , 2000                  | 984 UI.l <sup>-1</sup>                            | 19 mg.l <sup>-1</sup>                               | 3,96                              | NP   | 7,8          | THB                                | 0, 6 et 12           | <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> ,<br><i>S. aureus</i>  | bactériostatique                               |
| Bosch <i>et al.</i> , 2000                    | 100 UI.l <sup>-1</sup>                            | 30 mg.l <sup>-1</sup>                               | 19,59                             | 100  | 5,0          | TSA                                | 35                   | <i>Candida albicans</i> , <i>E. coli</i> ,<br><i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>   | bactériolytique                                |
| Boussouel <i>et al.</i> ,<br>2000             | 112,5 UI.l <sup>-1</sup>                          | 5040 UI.l <sup>-1</sup>                             | 0,2                               | 25   | 6,4          | lait                               | 25                   | <i>L. monocytogenes</i>   | bactériostatique                               |
| Revol-Junelles <i>et</i><br><i>al.</i> , 2001 | 42 UI.l <sup>-1</sup>                             | 4970 UI.l <sup>-1</sup>                             | 0,2                               | 12,5   | 6,4          | lait                               | 25                   | <i>L. monocytogenes</i><br><i>S. aureus</i><br><i>P. fluorescens</i><br><i>E. coli</i>  | bactériostatique<br>bactériostatique<br>-<br>- |
| McLay <i>et al.</i> , 2002                    | Activité de la<br>LPO/11,9                        | 187,5 mg.l <sup>-1</sup>                            | 4,17                              | 500  | 7,8          | THB                                | 37                   | <i>E. coli</i><br><i>S. aureus</i>  | bactériostatique<br>bactériolytique            |
| Dufour <i>et al.</i> , 2003                   | Activité de la<br>LPO/11,9                        | 0,5 mg.l <sup>-1</sup>                              | 0,013                             | 7,3  | 6,5 à<br>7,8 | Milieux TSB,<br>THB, BHI ou<br>M17 | 37 ou 42             | <i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus</i><br><i>cereus</i> , <i>Streptococcus</i><br><i>thermophilus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.</i><br><i>coli</i> , <i>Salmonella</i><br><i>Typhimurium</i> , <i>Yersinia</i><br><i>enterocolitica</i> ,<br><i>P. aeruginosa</i> | bactériostatique                               |

Tableau 3 : Comparaison des différentes concentrations des composants du LP-s utilisés dans la littérature

[GOD], concentration en GOD ; [LPO], concentration en LPO ; [glucose], concentration en glucose ; [SCN<sup>-</sup>], concentration en thiocyanate ; THB, milieu Todd Hewitt ; TSA, Trypcase Soja Agar ; TSB, milieu Trypcase Soja ; BHI, infusion cœur cerveau ; NP, Non Précisé. *E.* : *Escherichia*, *L.* : *Listeria*, *P.* : *Pseudomonas*, *S.* : *Staphylococcus*.

Les conditions opératoires choisies sont cependant déterminantes sur l'effet antibactérien du système. En effet dans le cas de *L. monocytogenes*, Boussouel *et al.* (2000), Kennedy *et al.* (2000), Revol-Junelles *et al.* (2001) et Dufour *et al.* (2003) ont mis en évidence un effet bactériostatique sur cette souche, avec des concentrations des composants du LP-s très différentes et avec des expérimentations réalisées autant dans des milieux de laboratoire que dans le lait. Plus récemment, Touch *et al.* (2004) ont mis en évidence un effet bactériostatique du système sur la croissance de certaines souches du genre *Salmonella*, mais le manque de détails sur les modes opératoires ne permet pas les comparaisons.

#### I.4. Applications et utilisations

Le rôle naturel exact de la LPO est mal connu mais il consiste probablement en une désinfection du canal gastro-intestinal du veau lors de la tétée (Shandholm *et al.*, 1988). Prieels *et al.* (1989) ont réalisé une étude du LP-s sur le veau. Le modèle *in vivo* consistait à contaminer les veaux avec la souche d'*E. coli* 510 et à les traiter ensuite avec le LP-s. Pour une concentration précise en lactoperoxydase, il était possible d'éviter le déclenchement de la diarrhée et de maintenir le veau sous alimentation lactée malgré une infection sévère par les colibacilles. De même, après apparition de la diarrhée provoquée par la bactérie, la lactoperoxydase était capable de faire régresser ce symptôme dans les 24 h et de freiner la croissance de la souche dans l'intestin, sans pour cela modifier le régime alimentaire. De plus les souches des matières fécales ne présentaient pas de différence notable entre les veaux traités et ceux non traités.

De nombreux essais ont été réalisés sur la préservation des qualités hygiéniques du lait cru (Reiter *et al.*, 1964 ; Björck *et al.*, 1979 ; Korhonen, 1980 ; Kamau et Kroger, 1984 ; FIL/IDH, 1988 ; Metwally et Nasr, 1992 ; Haddadin *et al.*, 1996 ; Seifu *et al.*, 2005) et sur les conséquences de cette action de conservation sur des produits tels que le fromage frais (Lara *et al.*, 1987), le cheddar, les yaourts et le beurre (Zall *et al.*, 1983). Des essais effectués sur le cottage cheese et sur le lait ont montré l'efficacité du système dans la régression d'une contamination due à *Pseudomonas* sp., à *E. coli* sp. et à *Salmonella* Typhimurium. Il en a été de même pour le lait maternisé contaminé par *S. Typhimurium* (Reiter *et al.*, 1976 ; Zall *et al.*, 1983 ; Garcia-Graells *et al.*, 2000 ; Garcia-Graells *et al.*, 2003 ; Seifu *et al.*, 2004 ; Touch *et al.*, 2004). L'action du LP-s est très efficace dans l'augmentation de la conservation des crèmes glacées et des crèmes pâtisseries (Perraudin, 1991). D'autres essais ont porté sur

l'efficacité de ce système pour la protection de la surface des fromages à pâte molle (Denis et Ramet, 1989), sur les crèmes glacées et les boissons délivrées en distributeur (Langley-Danysz, 1989).

Une série d'expériences conduites par Courtois *et al.* (1990) ont démontré l'action du LP-s contre des micro-organismes aérobies responsables chez les patients de parodontite chronique évolutive. La même équipe a mené une étude prouvant que l'ion hypothiocyanite était capable d'abolir l'effet cytopathique du virus de l'herpès et donc que cet ion était capable d'inhiber totalement le virus responsable de cette immunodéficience chez l'homme.

Par ailleurs, Langley-Danysz (1989) a observé que l'activation de la peroxydase salivaire réduisait l'apparition des caries, de parodontites et de la formation de la plaque dentaire, ce qui a conduit la société Colgate-Palmolive à incorporer le système dans du dentifrice.

Depuis plusieurs années, la FAO s'intéresse au système lactoperoxydasique pour aider à la conservation du lait cru dans les pays en voie de développement. En 1997, en collaboration avec l'OMS, le *Codex Alimentarius*, la FIL et l'Université d'Uppsala (en Suède), la FAO a réuni un comité d'experts internationaux pour la promotion de la conservation du lait cru lors de la collecte laitière par la méthode de la lactoperoxydase en Afrique de l'Ouest. Ce projet appelé "Global Lactoperoxidase Program" a débuté au Kenya. Son initialisation repose sur la constatation qu'en Afrique de l'Ouest plus de 5 millions de litres de lait sont perdus chaque année suite au manque de système de conservation entre le moment de la traite et l'arrivée à la laiterie. Plus de 80 pays ont témoigné en faveur du système.

Plusieurs brevets ont été déposés sur l'utilisation du LP-s par exemple en médecine, pour le traitement *in vivo* des infections à *Helicobacter pylori* ou dans des pesticides, pour contrôler les populations de micro-organismes pathogènes. Le nombre d'applications potentielles de ce système ne cesse de s'accroître. Des travaux ont montré que l'emploi du système en aquaculture permet de réduire la mortalité d'environ 30 % lors du sevrage des jeunes poissons (Van Hooijdonk *et al.*, 2000 ; Elotmani et Assobhei, 2004). De plus, il permet de lutter efficacement contre les infections du pou de mer (Kussendrager et van Hooijdonk, 2000). De nombreuses études sur la viande, sur des cubes ou sur des morceaux entiers ont été conduites et certaines ont amené le gouvernement australien à autoriser l'utilisation du système pour la

conservation de la viande au cours de son importation et son exportation (Kennedy *et al.*, 2000 ; McLay *et al.*, 2002 ; Elliot *et al.*, 2004).

Grâce à toutes ces études, l'association LPO/GOD/glucose/SCN<sup>-</sup> est considérée par le *Codex Alimentarius* comme auxiliaire technologique, en tant qu'agent de lutte contre les micro-organismes (CAC/GL 13-1991). Un avis de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), daté du 2 juin 2003, a autorisé l'emploi du système lactoperoxydasique comme auxiliaire technologique pour le traitement des salades de la IV<sup>ème</sup> gamme.

Les produits alimentaires élaborés à partir de lait à système LP actif ne sont pas significativement différents des témoins. Le principal inconvénient de son utilisation est l'augmentation du temps d'affinage des fromages ou d'élaboration du produit (production de la saveur, taux de coagulation ou production d'acide) (Reiter, 1985 ; Hui, 1993 ; Kumar et Mathur, 1994 ; Saad de Schoos *et al.*, 1999 ; Seifu *et al.*, 2005). De plus, des études réalisées avec des cellules HeLa (cellules humaines) et CHO (Chinese Hamster Ovary) ont montré qu'aucun effet toxique n'était décelé lors de l'utilisation du système LP (Reiter et Hárnyul, 1984).

## II. La flore bactérienne indésirable du poisson

### II.1. Les altérations bactériologiques

Des micro-organismes sont présents sur toutes les surfaces externes (peau et branchies) et dans les intestins du poisson vivant ou fraîchement capturé. La charge microbienne, très variable, est de l'ordre de  $10^2$  à  $10^7$  ufc.cm<sup>-2</sup> de peau et de  $10^3$  à  $10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> de branchies ou d'intestins (Shewan, 1962). Cette grande variabilité reflète l'environnement et l'alimentation des poissons (Huss et Eskildsen, 1974 ; Shewan, 1977 ; Liston, 1980).

### Pénétration des bactéries

Le muscle d'un poisson vivant est stérile et les foyers naturels de contamination correspondent aux régions du corps en contact avec l'eau (peau, mucus et branchies) et au tractus intestinal. La pénétration des bactéries s'effectue en partie par la peau, mais pour l'essentiel par le système vasculaire à partir des branchies et de la cavité abdominale. Les bactéries de l'intestin peuvent par ailleurs investir directement les muscles de la paroi abdominale, pénétration facilitée par l'action des enzymes digestives.



La nature du mucus est déterminante, car celui de certaines espèces présente des propriétés antibiotiques du fait de la présence de lysozymes et de certains anticorps (Shewan, 1977 ; Fletcher et Csonka, 1998). Dans le cas où ces propriétés antibactériennes n'existent pas, le mucus représente un foyer de contamination qu'il est nécessaire d'enlever par un lavage.

### **Dégradation du tissu musculaire**

La putréfaction résulte de l'action conjuguée des réactions de glycolyse, de lipolyse et de protéolyse. La plupart de la flore d'altération est impliquée dans ce phénomène à différentes échelles mais ce sont essentiellement les bactéries Gram-négatives qui en sont responsables, dont essentiellement *Shewanella putrefaciens*.

L'oxydation par les micro-organismes aérobies génère beaucoup plus d'énergie que la fermentation. En effet, l'oxydation complète d'une mole de glucose en 6 moles de CO<sub>2</sub> produit 36 moles d'adénosine triphosphate (ATP), alors que la fermentation d'une mole de glucose en 2 moles d'acide lactique n'en produit que 2. En conséquence, ce sont les micro-organismes aérobies qui se multiplieront initialement, permettant ainsi la formation de CO<sub>2</sub> comme produits finaux du métabolisme. La croissance de ces organismes aérobies engendre la formation de micro-régions partiellement anaérobies (Huss, 1988).

Les modifications les plus importantes de la fraction lipidique du poisson sont des réactions d'oxydation de nature essentiellement chimique mais aussi enzymatique (enzymes bactériennes et/ou musculaires). Ces réactions conduisent à l'apparition d'une odeur et d'un goût de ranci ou des phénomènes de décoloration, notamment chez les poissons gras. Il existe deux types de rancidité : l'autoxydation, due à la réaction entre l'oxygène moléculaire et les lipides insaturés, et l'autolyse, dont les produits principaux sont les acides gras libres et le glycérol.

L'autoxydation des lipides est un processus autocatalytique dont les différentes étapes ne sont pas encore totalement maîtrisées. La présence de doubles liaisons augmente la vitesse de cette réaction dont la première étape conduit à la formation d'hydroperoxydes, selon un phénomène radicalaire en chaîne. Quelques uns de ces peroxydes donnent naissance à des cétones sans que la chaîne carbonée soit altérée. D'autres composés, responsables de l'odeur et du goût de ranci, se forment à la suite de la dégradation de la chaîne carbonée et deviennent par la suite,

solubles dans l'eau et, de ce fait, vulnérables à l'attaque des bactéries qui les transforment en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (Huss, 1988).

Certains micro-organismes possèdent des lipoxydases qui catalysent la réaction entre ces acides et l'oxygène moléculaire. Les produits de la réaction se transforment ensuite en aldéhydes et cétones (Huss, 1988).

Le catabolisme des substances protéiques constitue la phase primordiale de la putréfaction. Selon un schéma classique, les protéines sont hydrolysées en polypeptides et en peptides, puis en acides aminés libres dont la concentration totale augmente dans le muscle. Ceux-ci sont ensuite métabolisés selon deux voies principales : des décarboxylations conduisant à la formation d'amines (comme la triméthylamine (TMA), la diméthylamine (DMA), la cadavérine, la putrescine...) dont certaines sont volatiles et des désaminations entraînant la production d'ammoniac (Watson, 1939 ; Sainclivier, 1983 ; Huss, 1988). La production d'ammoniac n'évolue pas de manière significative au début de la conservation ; elle augmente lors de la croissance des populations microbiennes (Soudan *et al.*, 1965 ; Sainclivier, 1983).

La réduction du TMAO (triméthylamine-N-oxyde) en TMA est une réaction d'altération bactérienne très connue. Beatty et Gibbons (1937) ont démontré la relation entre la charge bactérienne et la production de TMA. C'est lorsque les bactéries ont consommé l'oxygène présent dans le tissu musculaire que s'amorce la réduction du TMAO, dont l'équation a été formulée par Watson (1939).

Cette réaction permet aux micro-organismes non fermentatifs de se développer dans les tissus en condition micro-aérophile, voire anaérobie (Hobbs et Hodgkiss, 1982). Elle subit de manière déterminante l'effet du pH car elle a lieu entre pH 6,0 et 8,0 avec un optimum entre 7,2 et 7,4. De petites concentrations de DMA et de monométhylamine (MMA) proviennent également de l'altération d'origine bactériologique (Dyer, 1945).

Les amines biogènes sont définies, d'une manière générale comme des molécules biologiquement actives sur les systèmes nerveux central et vasculaire. Dans le domaine alimentaire, le terme « amines biogènes » correspond surtout aux amines non volatiles telles que la putrescine, la cadavérine, l'histamine (la plus étudiée dans le poisson), la spermine, la spermidine, la tyramine et la tryptamine qui proviennent de la décarboxylation des acides

aminés par les enzymes microbiennes et tissulaires (Wendakoon et Sakaguchi, 1992). L'augmentation de la concentration en amines biogènes traduit le développement bactérien, facteur essentiel dans le processus d'altération du poisson ; elle peut donc permettre l'évaluation de sa fraîcheur (Gouygou *et al.*, 1987). Les décarboxylases microbiennes sont largement responsables de la production d'amines biogènes et le rôle de l'autolyse est tout à fait mineur (Wendakoon et Sakaguchi, 1992). Les bactéries responsables de la production d'histamine sont par exemple *P. fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* et certains lactobacilles (Rice et Koehler, 1976 ; Joosten et Northolt, 1989 ; López-Sabater *et al.*, 1994 ; Roig-Sagues *et al.*, 1996). Les travaux de Mietz et Karmas (1977), Karmas et Mietz (1978) et de Karmas (1981) s'attachent en revanche au rôle d'un ensemble d'amines biogènes (histamine, putrescine, cadavérine, spermine et spermidine) comme critère de fraîcheur.

## II.2. Les principaux micro-organismes

Les micro-organismes indésirables sont opportunistes et responsables d'une forte mortalité chez les poissons d'élevage aussi bien que chez ceux qui vivent en liberté (Ronald, 1979).

L'eau, surtout quand elle est fortement chargée en matières organiques, est un milieu idéal pour toute espèce de micro-organismes. Des études précédentes ont montré que la flore bactérienne naturelle du poisson est le reflet de celle de l'eau où il vit et qu'elle contient également de rares espèces bactériennes qui sont des parasites obligatoires parce qu'incapables de survivre longtemps en dehors du poisson qui est normalement leur habitat (Ronald, 1979).

La flore pathogène du poisson doit souvent sa présence sur ou dans le poisson à la proximité de l'homme. Cette flore comprend *Aeromonas caviae*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. veronii* spp. *sobbria*, *A. veronii* spp. *veronii*, *Edwarsiella* spp., *E. tarda*, *Flavobacterium psychrophilum*, *L. monocytogenes*, *Pasteurella piscida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Vagococcus* sp., *Vibrio anguillarum*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *Yersinia ruckeri* (Sadovski et Levin, 1969 ; Mulak *et al.*, 1992).

La flore d'altération du poisson est beaucoup plus complexe à analyser de par les interactions entre les différentes souches et surtout leur nombre comme le montre cette liste non exhaustive : *Aeromonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens*, *C.*

*maltaromaticum*, *Enterobacter* sp., *Hafnia alvei*, *Halobacterium* sp., *Halococcus* sp., *Lactobacillus alimentarius*, *Lb. farciminis*, *Lb. plantarum*, *Lc. piscium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas* sp., *Serratia liquefaciens*, *Shewanella putrefaciens*, *Streptococcus difficile*, *St. iniae*, *St. parauberis*, *Enterococcus faecalis* (Lerke *et al.*, 1963 ; Levin, 1968 ; Sadovski et Levin, 1969 ; Mulak *et al.*, 1992 ; Gram et Huss, 1996 ; Joffraud *et al.*, 2001).

Cette flore se divise en plusieurs groupes en fonction des altérations physiques et organoleptiques occasionnées par les bactéries sur la chair du poisson (Joffraud *et al.*, 2001 ; Cardinal *et al.*, 2004).

### II.2.1. *Listeria monocytogenes*, flore pathogène

Le genre *Listeria* est constitué de bactéries largement répandues dans le milieu extérieur. Il compte actuellement six espèces dont deux, *L. ivanovii* et surtout *L. monocytogenes* sont responsables d'infections chez l'homme et/ou chez l'animal (Mc Lauchlin, 1997). Durant de nombreuses années, les listérioses étaient principalement considérées comme des maladies des animaux même si des cas sporadiques et parfois dramatiques étaient décrits chez l'homme. Dans les années 1979/1980, *L. monocytogenes* a été identifiée comme l'une des bactéries responsables d'infections d'origine alimentaire.

Les *Listeria* sp. sont des petits bacilles droits (quelques cellules peuvent être incurvées), de 0,4 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 2,5 µm de longueur, aux extrémités arrondies, se présentant de manière isolée ou groupés en V ou en L ou en palissades ou, parfois, en courtes chaînes. Ce sont des bactéries à Gram-positif, non acido-résistantes, non capsulées, non sporulées, aéro-anaérobies facultatives mais cultivant mieux en aérobiose et mobiles lorsqu'elles sont cultivées à 20-30 °C. Une réponse positive est notée pour le test catalase mais quelques rares souches sont catalase négative. Le pourcentage en G + C est compris entre 36 et 42 % (Brenner, 1988 ; Daneshvar et Brooks, 1989 ; Pine *et al.*, 1989).

Les *Listeria* sp. ne sont pas des germes exigeants et leur culture est obtenue sur les milieux classiques tels qu'une gélose nutritive, une gélose au sang ou un milieu trypticase-soja supplémenté en extrait de levure (TS-YE). La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C mais la croissance est possible entre 1 et 45 °C ; certaines souches peuvent même se développer avec un temps de génération de 62 à 131 h, à des températures

légèrement inférieures à 0 °C (Rosenow et Marth, 1987 ; Juntilla *et al.*, 1988 ; Walker *et al.*, 1990 ; Ryser et Marth, 1991).

Le pH optimal est de 7 ou légèrement alcalin mais la croissance est obtenue dans une large gamme de pH. Classiquement, il était admis que les souches pouvaient croître entre pH 5,6 et 9,0 (voire 9,6 pour certaines souches). En fait, des souches de *L. monocytogenes* sont aptes à se multiplier à des pH de l'ordre de 4,3-4,6 lorsqu'elles sont placées dans un bouillon tryptic soja incubé à 30 °C. En revanche, toutes les souches meurent en quelques heures lorsqu'elles sont placées dans un milieu dont le pH est inférieur à 3,3 et de nombreuses souches meurent à un pH inférieur à 5,5 (Ryser et Marth, 1987 ; Georges *et al.*, 1988 ; Ita et Hutkins, 1991).

Les souches du genre *Listeria* présentent une certaine halotolérance et toutes les souches cultivent en présence de 10 % (p/v) de NaCl. Certaines souches tolèrent même des concentrations en sel de 20 % et/ou peuvent survivre un an, à pH 6 dans un milieu contenant 16 % (p/v) de NaCl.

La valeur optimale de l' $a_w$  est de 0,97, mais la croissance est possible à 0,943 alors qu'elle est nulle à une  $a_w$  inférieure à 0,92. Toutefois, le germe reste viable (sans multiplication) plusieurs jours pour des valeurs d' $a_w$  plus faibles (par exemple, 84 jours à 4 °C dans un salami dont l' $a_w$  est de 0,79-0,86) (Conner *et al.*, 1986 ; Seeliger et Jones, 1986 ; Papageirgiou et Marth, 1989 ; Patchett *et al.*, 1992 ; Ko *et al.*, 1994).

*In vitro*, *L. monocytogenes* et les autres espèces de ce genre sont généralement sensibles à de nombreux antibiotiques : pénicilline G, ampicilline, amoxicilline, azlocilline, imipénème, gentamicine, sisomicine, nétilmicine, amikacine, kanamycine, streptomycine, érythromycine, clarithromycine, roxithromycine, tyrothricine, vancomycine, teicoplanine, daptomycine, triméthoprim-sulfaméthoxazole, rifampicine et tétracyclines. Une résistance naturelle est notée vis-à-vis des céphalosporines (notamment des céphalosporines de 3ème génération à large spectre comme la céfotaxime ou la céfépime), de l'aztréonam, de l'acide nalidixique, de l'ofloxacine (la D-ofloxacine est complètement inactive alors que le deuxième composant de l'ofloxacine, la lévofloxacine, est modérément active), des fluoroquinolones récentes et de la fosfomycine. La sensibilité est intermédiaire pour la céfalotine, la ciprofloxacine, le chloramphénicol et la clindamycine (Hof *et al.*, 1997).

Les *Listeria* sp. sont des bactéries résistantes (survie de 1 à 2 ans dans le sol, 21 mois dans du lait naturellement contaminé, 1 à 18 mois dans les fèces, 6 mois dans la paille), qui sont très

largement répandues dans l'environnement (sols, végétaux, pâturages, eaux douces, eaux de mer, vase, eaux d'égouts), dans les locaux d'élevage (litière, sol, parois, fenêtres, mangeoires, abreuvoirs...) (Weiss et Seeliger, 1975). Dans l'eau ambiante des poissons (en rivière, en mer ou en aquaculture), ces bactéries vont ainsi contaminer le poisson.

### II.2.2. Flore d'altération

#### ***Brochothrix thermosphacta***

Sulzbacher et McLean (1951) isolent une souche bactérienne de saucisse de porc ; ils la classent dans le genre *Microbacterium* en tant que *M. thermosphactum* (Sneath et Jones, 1976). Les différences entre *M. thermosphactum* et *M. lacticum* reposent sur la morphologie (Davidson *et al.*, 1968), les profils d'enzymes et de protéines (Schleifer *et al.*, 1968 ; Schleifer, 1970) et sur la composition du peptidoglycane (Collins-Thompson *et al.*, 1972). Par taxonomie numérique, les souches de *M. thermosphactum* forment un taxon relativement homogène (avec une similarité de 85 %) différent de celui de *M. lacticum* (Davis *et al.*, 1969 ; Davis et Newton, 1969 ; Wilkinson et Jones, 1977). En 1976, l'espèce *M. thermosphactum* est rangée dans le nouveau genre *Brochothrix* et est nommée *B. thermosphacta* (Sneath et Jones, 1976). Ce genre regroupe huit espèces. En 1988, Talon *et al.* identifient par hybridation ADN-ADN une nouvelle espèce, *B. campestris*, issue de différents habitats, bœuf, porc, lapin, abattoirs, sols, fèces et laine de mouton, foin et herbe.

Les cellules du genre *Brochothrix* se présentent sous forme de bâtonnets à Gram-positif, minces, réguliers, non branchés, isolés ou parfois en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, aéro-anaérobies, catalase positive, oxydase négative. Leur température optimale de croissance est comprise entre 20 et 25 °C, mais la croissance de cette souche est possible entre 0 et 30 °C. Ce sont donc des bactéries psychrotrophes ayant la possibilité de se développer aux températures de réfrigération entre pH 5,0 et pH 9,0 (Brownlie, 1966). La croissance est possible en présence de 6,5 % NaCl. Ce sont des bactéries dont la croissance est inhibée par les nitrites (le degré d'inhibition est lié à la température et au pH). Cette espèce ne survit pas à un chauffage de 63 °C pendant 5 min.

*Brochothrix thermosphacta* a été détecté dans le saumon fumé par Cann *et al.* (1984), Truelstrup et Hansen (1995), Truelstrup *et al.* (1996) et Leroi *et al.* (1998). Cette souche, cultivée sur poisson, est à l'origine des odeurs et saveurs de piquant, d'aigre et de ranci (Leroi

*et al.*, 1998). Joffraud *et al.* (2001) ont montré l'impact sensoriel de *B. thermosphacta* sur l'altération du poisson par l'analyse des composés volatils.

Cette espèce est généralement sensible à l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine, l'amikacine, la fosfomycine, la kanamycine, la streptomycine, l'érythromycine, la tobramycine, la nétilmicine, la vancomycine, la teicoplanine, la rifampicine, aux fluoroquinolones et aux tétracyclines. Cette souche est résistante à la pénicilline G, aux céphalosporines, à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine, à la polymixine B et aux sulfamides.

### ***Carnobacterium maltaromaticum***

Le genre *Carnobacterium* a été proposé en 1987 par Collins *et al.* (1987) pour classer *Lactobacillus carnis*, *Lb. divergens* et *Lb. piscicola* ainsi que des souches ressemblant à des lactobacilles et isolées de viandes de volaille par Thornley (1957).

Les auteurs dénomment ce nouveau genre *Carnobacterium* ; ils valident les espèces *C. divergens* et *C. maltaromaticum* et décrivent deux nouvelles espèces *C. gallinarum* et *C. mobile*. Ce genre compte actuellement huit espèces. Mora *et al.* (2003) montrent que *C. piscicola* et *Lb. maltaromaticus* sont des synonymes hétérotypiques. L'épithète spécifique *maltaromaticus* ayant priorité sur celle de *piscicola*, les auteurs valident pour ce taxon la nomenclature de *C. maltaromaticum*. Selon Montel *et al.* (1991), il pourrait exister deux sous-espèces au sein de l'espèce *C. maltaromaticum*.

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram-positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou parfois en courtes chaînes, non sporulés, mobiles ou immobiles, aéro-anaérobies, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, à métabolisme fermentatif (production d'acide lactique), incapables de croître sur des milieux à l'acétate, ne cultivant ni en présence de 8 % de NaCl ni à 45 °C, cultivant à 10 °C et parfois à 0 °C (Collins *et al.*, 1987).

Il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. Les *Carnobacterium* sp. ne cultivent pas sur les milieux à l'acétate de Rogosa, sont capables de se développer à des pH élevés (croissance possible jusqu'à pH 9,1) et sont parfois mobiles. Ils produisent principalement de l'acide L-lactique ; leur principal acide gras est l'acide oléique et leur peptidoglycane est du type A1 $\gamma$ .

*L'espèce C. maltaromaticum* cultive sur de nombreux milieux dont la gélose trypcase soja (TSA-YE), la gélose cœur-cervelle (BHI) et le bouillon MRS (De Man, Rogosa et Sharpe). Sa température optimale de croissance est 30 °C, sa croissance est possible entre 4 et 40 °C mais pas à 0 °C. Le pH optimal de croissance est compris entre 6 et 7. Les colonies sont minuscules (diamètre inférieur à 2 mm), convexes, circulaires, blanches et non pigmentées après 48 h d'incubation à 30 °C sur TSA-YE.

Certaines souches de *C. maltaromaticum* produisent des bactériocines actives sur d'autres bactéries lactiques et/ou sur d'autres espèces bactériennes d'altération ou sur des pathogènes. Plusieurs carnocines, actives notamment contre *L. monocytogenes*, ont ainsi été découvertes : les carnobactériocines BM1, A et B2 (Quadri *et al.*, 1994 ; Worobo *et al.*, 1994 ; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996), les carnocines U149, CP5, CP51 et CP52 (Stoffels *et al.*, 1992 ; Mathieu *et al.*, 1993 ; Millière *et al.*, 1994 ; Herbin *et al.*, 1997), les piscicolines 61, V1b, 126 et V1a (Holck *et al.*, 1994 ; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996 ; Jack *et al.*, 1996 ; Herbin *et al.*, 1997). D'autres études ont mis en évidence la production de bactériocines par des souches de *C. divergens*, la divercine V41 (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1997 ; Metivier *et al.*, 1998) et les divergicines A et 750 (Worobo *et al.*, 1995 ; Holck *et al.*, 1996).

*In vitro*, les souches de *C. maltaromaticum* isolées de poisson sont sensibles à l'ampicilline, au chloramphénicol, aux aminosides, à la pénicilline A, à la furazolidone et à la tétracycline. En revanche, l'acide nalidixique, l'érythromycine, la novobiocine, la streptomycine et les sulfamides sont inactifs.

*Carnobacterium maltaromaticum* a été trouvé dans différents produits de transformation du saumon (Leisner *et al.*, 1994 ; Leroi *et al.*, 1998). Cette espèce est faiblement altérante dans la mesure où une population élevée n'est pas responsable d'une forte altération (Leroi *et al.*, 1996 ; Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Nilsson *et al.*, 1999). Lorsque sa population est assez importante, *C. maltaromaticum* dégage une odeur forte de rance (acide butyrique), déjà observée dans les produits à base de viande (Borch *et al.*, 1996 ; Joffraud *et al.*, 2001).

### ***Shewanella putrefaciens***

Les nomenclatures d'*Alteromonas hanedai* et d'*A. putrefaciens* ont été publiées en 1981. *A. hanedai* constituait une nouvelle espèce et *A. putrefaciens* correspondait à un taxon



préalablement décrit sous le nom de "*Achromobacter putrefaciens*" puis de "*Pseudomonas putrefaciens*".

L'étude des séquences des ARNr 5S permet à McDonnell et Colwell (1985) de reclasser les espèces *A. hanedai* et *A. putrefaciens* dans le genre *Shewanella* dont la nomenclature sera validée en 1986. L'individualisation du genre *Shewanella* reposait avant tout sur la structure de l'ARNr 5S et sa description était extrêmement sommaire : bacilles à Gram-négatif, droits ou incurvés, non pigmentés, mobiles grâce à une ciliature polaire, chimio-organotrophes, oxydase positive, ayant pour habitat principal l'eau douce ou l'eau de mer et dont le pourcentage en G + C varie de 44 à 47. Une analyse phylogénétique (étude des séquences des ARNr 16S), publiée par Gauthier *et al.* (1995), a permis de confirmer la validité du genre *Shewanella*.

Par la suite, plusieurs espèces ont été décrites, si bien qu'aujourd'hui, le genre *Shewanella* regroupe 34 espèces. Il n'est pas inclus dans la famille des *Alteromonadaceae* définie par Ivanova et Mikhailov (2001). Cependant, dans la deuxième édition du volume deux du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, *Shewanella* sp. est classé dans la famille "*Alteromonadaceae*" dont la définition est différente de celle des *Alteromonadaceae* de Ivanova et Mikhailov (2001).

En se fondant sur les homologues ADN-ADN, Owen *et al.* (1978) avaient décrit l'existence de quatre groupes au sein de l'espèce "*Ps. putrefaciens*" actuellement dénommée *S. putrefaciens*. Le groupe I, qui renferme la souche type de l'espèce, correspond à *S. putrefaciens sensu stricto*. Les souches du groupe II sont généralement assimilées à l'espèce *S. baltica*. Le groupe III pourrait correspondre à *S. oneidensis* mais des hybridations ADN-ADN doivent être effectuées avant de conclure de manière définitive. Les souches du groupe IV, qui possèdent un pourcentage en G + C élevé (52 à 55 contre 43 à 47 pour les souches des trois autres groupes), ont été reclassées dans l'espèce *S. algae*.

Les espèces du genre *Shewanella* rassemblent des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, de 1,5 à 4,6 µm de longueur sur 0,4 à 1 µm de diamètre, non sporulés, mobiles grâce à un unique flagelle polaire non entouré d'une gaine protéique, capables de croître en présence de 3 % de NaCl, oxydase positive, catalase positive, réduisant généralement les nitrates en nitrites, non indologènes, ne produisant pas d'acétoïne. Ces bactéries sont lysine

décarboxylase négative, ornithine décarboxylase négative et arginine di-hydrolase négative. En anaérobiose, plusieurs espèces du genre *Shewanella* sont aptes à réduire le *N*-oxyde de triméthylamine, l'oxyde de fer, l'oxyde de manganèse, l'oxyde de chrome, le fer, l'uranium, le thiosulfate ou le soufre. Cette réduction est couplée à la production d'énergie. Les colonies sont généralement circulaires, à contour régulier, convexes, lisses et d'un diamètre de 1 à 4 mm. Sur gélose de Luria et Bertani, *S. algae*, *S. amazonensis*, *S. frigidimarina*, *S. gelidimarina*, *S. oneidensis* et *S. putrefaciens* donnent des colonies rosâtres.

*Shewanella putrefaciens* est une espèce naturellement résistante à la pénicilline A, à la bacitracine, aux fluoroquinolones et aux phénicols. Elle est sensible à l'érythrocline, à la pristinamycine, aux sulfamides et aux aminosides.

Cette espèce est la principale responsable du phénomène de putréfaction qui survient au cours de l'altération du poisson ; elle est connue pour produire des composés volatils tels que le TMA ou des composés sulfurés comme le diméthyle disulfure (Miller *et al.*, 1973a ; Dainty et Mackey, 1992 ; Gram et Melchiorson, 1996). Cette bactérie est à l'origine des très fortes odeurs de putréfaction et d'H<sub>2</sub>S. Cette souche est fortement altérante car une faible population est à l'origine d'importantes modifications organoleptiques du poisson (Joffraud *et al.*, 2001).

### III. Le poisson

#### III.1. Le poisson modèle

La truite appartient à l'ordre des Clupéiformes de la famille des Salmonidés. De nombreuses espèces de poisson, de même famille que le saumon, sont appelées truites. La plupart des truites vivent exclusivement en eau douce et notamment dans les lacs et les cours d'eau des régions nordiques ou tempérées. Les truites peuvent être séparées en deux groupes : la truite arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss* ou *Salmo gairdneri*) et les truites fario (*Salmo trutta fario*), de lac (*Salmo trutta lacustris*) ou de mer (*Salmo trutta trutta*).

#### III.2. Les altérations intervenant après la mort du poisson

Les premières modifications du tissu musculaire survenant après la mort du poisson sont dues aux enzymes musculaires et digestives. Suite à la pénétration et au développement des bactéries dans le muscle, celles-ci deviennent alors les acteurs essentiels de la dégradation.

### III.2.1. Les altérations autolytiques

Après la mort du poisson, l'oxygène n'est plus renouvelé et la production d'énergie s'arrête. Dans le muscle, stérile chez le poisson vivant, s'amorcent de nouveaux processus caractérisés par la glycolyse et la dégradation de l'ATP.

L'arrêt de la circulation sanguine est responsable de toute l'évolution *post mortem* du tissu musculaire du poisson, selon le mécanisme décrit par Jouve *et al.* (1991) dans la viande. Une conséquence essentielle est l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui va déterminer l'activation des mécanismes biochimiques conduisant d'une part à la glycolyse et à l'acidification du muscle et d'autre part à l'installation de la rigidité cadavérique. Après la mort, le  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne à la fois l'activation de la myosine ATP-ase, donc l'hydrolyse de l'ATP, et la réaction de Lohman, c'est-à-dire la resynthèse de l'ATP. Lorsque la réserve en phosphates énergétiques s'épuise, l'ATP n'est plus reconstitué (Tarr, 1966). Le processus aboutit à la formation d'acide lactique. L'abaissement du pH entraîne l'arrêt de la glycolyse.

Le phénomène de « *rigor mortis* » résulte de la conjonction de plusieurs facteurs. La diminution de la concentration d'ATP favorise la formation de liaisons entre l'actine et la myosine. Le muscle commence à perdre son élasticité lorsque le taux d'ATP chute à 80 % environ de sa valeur initiale (Jouve *et al.*, 1991). Lorsque le taux d'ATP devient nul, l'acide lactique est à son taux le plus élevé et la « *rigor mortis* » est maximale (Sikorski, 1980).

Une différence essentielle caractérisant le poisson par rapport à la viande réside dans le fait que la rigidité cadavérique et sa résolution interviennent très rapidement, après respectivement 5 et 30 h environ à 0 °C. Le processus est beaucoup plus long dans la viande puisque la résolution demande 15 j à 0 °C (Cheftel et Cheftel, 1984). Ceci s'explique notamment par les conditions de capture du poisson, car l'activité musculaire et l'asphyxie réduisant le stock de glycogène, activent l'apparition de la « *rigor mortis* » et diminuent sa durée.

La baisse du pH est plus faible que dans la viande. L'acidification est liée à la teneur en glycogène à la mort de l'animal ; or la réserve de glycogène se trouve très réduite chez le poisson compte tenu des techniques de pêche. D'autre part, le tissu musculaire du poisson a

un fort pouvoir tampon (Cutting, 1953). Ainsi le pH passe de 7,0 à 6,2-6,5 en moyenne, alors que dans la viande il descend jusque 5,0-5,7. Ceci contribue à l'instabilité du poisson après la mort, les valeurs de pH atteintes n'inhibant pas la prolifération bactérienne.

La teneur en hypoxanthine a été proposée comme indice de fraîcheur mais elle donne de très mauvaises indications chez certaines espèces. Saito *et al.* (1959) a défini l'évaluation de l'altération (par les dérivés de l'ATP) par la détermination du rapport K qui dépend de la teneur de tous les dérivés. Ce rapport a été simplifié d'abord par Jones et Murray (1964), puis par Luong et Male (1992). Ce critère, particulièrement intéressant dans les premiers stades de l'altération, est une expression de l'autolyse et augmente dès la mort de l'animal, avant tout développement de la flore bactérienne (Malle, 1992).

Les enzymes du tractus intestinal jouent un rôle indirect dans la détérioration du tissu musculaire en dégradant les viscères puis la paroi abdominale, préparant ainsi la pénétration des bactéries. Ces enzymes produisent de longs polypeptides de pH variable qui sont ensuite réduits en peptides par des exopeptidases (Granroth *et al.*, 1978).

### III.2.2. Les altérations physiques

Lorsque le poisson meurt, son pH est faiblement alcalin (7,05–7,25), excepté chez certaines espèces où il descend jusqu'à 5,4. En général, le pH diminue dans l'heure qui suit la capture entre 6,5 et 6,8 (Soudan *et al.*, 1965). Cette acidification est liée à la dégradation des sucres, mais la réduction des sources azotées fait revenir la valeur du pH à la neutralité. Un pH proche de 7,0 favorise le développement bactérien et augmente l'activité enzymatique. Un pH moyen supérieur à 7,5 indique pour la plupart des espèces, à l'exception du saumon du pacifique dont le pH reste à 6,2, qu'un poisson devient inconsommable (Soudan *et al.*, 1965). Cependant, les variations sont telles que l'exploitation de ce paramètre n'est pas généralisé pour suivre l'altération du poisson.

Le potentiel d'oxydo-réduction du muscle du poisson fraîchement capturé est généralement supérieur à zéro (Huss *et al.*, 1995). Suite à la mort, cette valeur passe de + 250 mV à - 130 mV. Ceci résulte de la raréfaction en oxygène dissous du milieu et de son enrichissement en substances réductrices. La prolifération de bactéries aérobies et l'oxygénation des lipides entraînent une baisse encore plus importante du potentiel d'oxydo-réduction (- 250 mV)

(Sainclivier, 1983). L'altération du poisson avançant, la production d'amines tertiaires provoque l'augmentation de ce potentiel jusqu'à sa valeur initiale (Castell, 1950).

Certains auteurs mentionnent que la diminution rapide de la résistance électrique, survenant dans les quelques heures qui suivent la mort, est due à une désorganisation de la structure ordonnée de l'eau à la surface des protéines (Jason et Lees, 1971). Pendant le stockage, la perméabilité des membranes aux éléments chargés augmente, ce qui conduit à une diminution cette résistance.

Plusieurs facteurs, tels que la concentration de matières grasses et la température, peuvent affecter les propriétés électriques du muscle. En outre, les dégâts mécaniques causés aux tissus et la décongélation entraîneront des modifications considérables. Tous ces facteurs devront être pris en compte si les propriétés électriques du poisson sont utilisées à des fins de contrôle (Huss, 1988).

### III.2.3. Les altérations organoleptiques

Les modifications organoleptiques sont perçues par les sens ; elles affectent l'apparence, l'odeur, la texture et la saveur.

Parmi les conséquences de l'altération bactérienne du poisson, l'apparition d'odeurs, souvent désagréables, est la plus significative. Des odeurs différentes sont décelées au cours de l'altération selon l'espèce de poisson et les bactéries présentes. Seulement un faible pourcentage de bactéries testées produisent un changement organoleptique perceptible. Les travaux de Miller *et al.* (1973b) et ceux de Joffraud *et al.* (2001) ont permis d'identifier certains composés responsables des odeurs ; ce sont notamment le diméthylsulfure, le diméthyldisulfure, l'acétaldéhyde, l'éthylacétate, l'éthylalcool, le méthylmercaptan, le butyrate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle et la butanone. D'autres substances, plus communément décelées dans le poisson, sont impliquées comme l'ammoniac, la DMA, la TMA, l'acide sulfhydrique et l'hydrogène sulfuré.

Parallèlement à l'odeur, l'évolution de divers caractères de l'altération est observée. La peau, les branchies, le mucus et l'œil font partie des caractères extérieurs qui subissent des modifications. La rigidité du corps est également affectée ; ce dernier s'amollit après un raidissement passager.

Lors de l'altération, l'évolution du goût se traduit en premier lieu par une atténuation prononcée de la saveur spécifique qui est progressivement remplacée par des saveurs étrangères (lactique, acétique, butyrique, amère, sulfurée, ammoniacale), saveurs différentes suivant les espèces et la nature des contaminations (Soudan *et al.*, 1965). La dégradation organoleptique du poisson concerne aussi le rancissement.

La détermination et l'exploitation de l'évolution des divers caractères de l'altération ont été rationalisées et permettent ainsi une appréciation suffisamment exacte pour être considérée comme objective alors qu'elle repose sur une somme d'évaluations subjectives (Soudan *et al.*, 1957). L'inconvénient majeur d'une denrée alimentaire comme le poisson est que son altération est peu maîtrisée et que l'estimation de son niveau de fraîcheur est très difficile. La mesure de l'indice de fraîcheur est d'intérêt limité car elle ne peut se faire avec précision que sur des poissons entiers.

### III.3. Les techniques de conservation utilisées pour le poisson

#### III.3.1. Les agents physiques

Le premier agent physique utilisé est la température soit par le froid, soit par le chauffage. La réfrigération (0 – 5 °C) est le mode de conservation le plus utilisé car elle permet de ralentir la croissance des bactéries, donc de freiner la dégradation. Seules les bactéries psychrotrophes poursuivent leurs activités réduites à ces températures. Dans la majorité des cas, le poisson frais est transporté dans des caisses avec de la glace pilée, ce qui facilite l'échange thermique par l'intermédiaire de l'eau de fusion. Dans les cas de la congélation et en surgélation ( $\leq -18$  °C), l'eau, sous forme de cristaux de glace, n'est plus disponible pour les bactéries (diminution de l'activité de l'eau), ce qui stoppe leur développement. En revanche, une diminution des structures par éclatements cellulaires est observée, ce qui diminue les qualités texturales des produits après décongélation. La seule altération chimique observée pendant une congélation prolongée est l'autoxydation des lipides (phénomène inhibé au-dessous de -30 °C).

Le chauffage va intervenir lors de la mise en conserve (technique d'appertisation). D'après Sainclivier (1983), plus un poisson est altéré, plus les produits de dégradation augmentent au cours de la stérilisation ; ceci souligne l'importance de la qualité initiale du produit. L'effet de la mise en conserve va conduire à une dénaturation irréversible des protéines qui inhibe le

développement des micro-organismes. D'autres composés vont aussi subir ce chauffage : les lipides vont donner des hydroperoxydes, les sucres vont favoriser la réaction de Maillard et les composés azotés vont être plus facilement libérés.

Le fumage est un autre agent physique possible. La composition de la fumée est bien connue (Gilbert, 1975 ; Hamm, 1977). Elle compte plus de deux cents constituants dont de l'hydrogène, du monoxyde de carbone, du dioxyde de carbone, des phénols, des dérivés méthylés.... Ces composés vont jouer un rôle sur la coloration, l'arôme et la texture ; ils vont modifier les qualités chimiques et sensorielles des poissons (Leroi et Joffraud, 2000). Ils possèdent également une action chimique et antibactérienne (Leblanc *et al.*, 2000 ; Leroi et Joffraud, 2000 ; Leroi *et al.*, 2000). Les phénols ont une action importante comme antioxydant des lipides (Sainclivier, 1985). Dans le fumage à chaud, c'est surtout la chaleur qui diminue la charge microbienne alors que c'est la fumée qui y contribue dans le fumage à froid. Shewan (1961) a montré l'action bactériostatique du formol et aussi de la fraction des phénols à bas point d'ébullition. Les levures et les moisissures sont peu sensibles à la fumée.

L'ionisation est le plus récent agent physique utilisé (anciennement irradiation). C'est une technique efficace, mais onéreuse, qui a une mauvaise image auprès des consommateurs. Le Cobalt 60 est principalement employé pour l'ionisation de type  $\gamma$  à des intensités variables, avec une incidence sur les micro-organismes proportionnelle à l'intensité utilisée. Ces intensités sont définies par Justine (1985) : la radurisation (1 à 10 kGy), la radication (10 à 20 kGy) et la radappertisation (40 à 50 kGy).

### III.3.2. Les agents chimiques

La directive 95/2/CE fixe les différents conservateurs autorisés dans les produits de la pêche (Tableau 4).

Lors du salage, l'action du sel (NaCl) consiste en une déshydratation des tissus, ce qui diminue la disponibilité de l'eau libre nécessaire aux réactions chimiques et enzymatiques d'altération (sauf lipase et ligase). Les ions chlorures ont une action létale sur les protéines cellulaires et diminuent la solubilité de l'oxygène (Zuggaramurdi, 1976). En revanche, pour les micro-organismes halophiles, la concentration élevée en sel leur est favorable. Ainsi certaines bactéries, levures et moisissures peuvent se développer et participer à l'altération.

| N° CEE | Nom                   | N° CEE | Nom                        |
|--------|-----------------------|--------|----------------------------|
| E200   | Acide ascorbique      | E220   | Anhydride sulfureux        |
| E202   | Sorbate de potassium  | E221   | Sulfite de sodium          |
| E203   | Sorbate de calcium    | E222   | Sulfite acide de sodium    |
| E210   | Acide benzoïque       | E223   | Disulfite de sodium        |
| E211   | Benzoate de sodium    | E224   | Disulfite de potassium     |
| E212   | Benzoate de potassium | E226   | Sulfite de calcium         |
| E213   | Benzoate de calcium   | E227   | Sulfite acide de calcium   |
| E315   | Acide erythorbique    | E228   | Sulfite acide de potassium |
| E316   | Erythorbate de sodium |        |                            |
| E385   | Calcium disodium EDTA |        |                            |

Tableau 4 : Conservateurs utilisés en France dans les produits de la pêche (directive 95/2/CE)

Les phosphates et les polyphosphates (E338-452) augmentent la capacité de rétention d'eau de la chair de poisson salée et, par leur effet émulsifiant, en améliorent la consistance. Ils sont utilisés en complément de la salaison. Ils sont strictement interdits en France, non parce qu'ils sont toxiques mais parce qu'ils participeraient au déséquilibre du rapport phosphocalcique dans l'organisme humain (Sainclivier, 1985).

Généralement les nitrites (E249, E250) sont utilisés pour leur propriété bactériostatique mais aussi dans la viande pour la stabilisation de la couleur par formation de nitrosomyoglobine. Comme les phosphates, ils sont interdits en France pour plusieurs raisons pour une utilisation sur du poisson ; mais ils sont autorisés dans certains pays comme la Suède ou la Finlande. Ils sont hypotenseurs et entraînent la formation de N-nitrosamine carcinogène (Swan, 1975). Kikuchi et Ishimoto (1980), Zumft (1993), Ye *et al.* (1994) et Ye *et al.* (1995) ont montré que les nitrites pouvaient être réduits à la place du TMAO par des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif comme *E. coli*, *Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*.

### III.3.3. Les bio-conservateurs

Les bactériocines de bactéries lactiques présentent un intérêt potentiel d'application en conservation alimentaire par leur capacité à inhiber certaines bactéries pathogènes ou d'altération des aliments (De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Holtz et Stahl, 1995). En France, la seule bactériocine utilisée en tant qu'additif alimentaire est la nisine (E234). Les bactériocines des bactéries lactiques sont des molécules directement produites par synthèse ribosomique sous la forme de polypeptides ou de précurseurs de polypeptides, subissant ou non des modifications post-traductionnelles. La plupart des bactériocines exercent leur activité létale non seulement sur des souches appartenant à la même espèce que le micro-organisme



producteur, mais aussi sur des bactéries à Gram-positif phylogénétiquement éloignées. De plus, cette activité semble s'exercer exclusivement au niveau de la membrane des cellules cibles. La cellule productrice synthétise une molécule qui l'immunise contre l'action de sa propre bactériocine.

Des études utilisent des productions de bactériocines *in situ* afin de limiter la croissance de *L. monocytogenes*, effet bactériostatique observé à 4 °C, dans le saumon fumé (Duffes *et al.*, 1999 ; Brillet *et al.*, 2004).

L'utilisation couplée d'un système LP actif et de bactériocines telles que la nisine permet d'élargir le spectre d'action du système et d'obtenir une inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* supérieure à la somme des effets individuels (Rodriguez *et al.*, 1997). L'étude de la combinaison du LP-s et de la nisine au moyen de plans d'expériences a confirmé cet effet synergique et a mis en évidence l'effet antibactérien à long terme (Boussouel *et al.*, 1999). Lorsque la nisine est ajoutée en début d'expérience et le LP-s dans les 4 h suivantes, un effet bactériostatique est d'abord observé contre *L. monocytogenes*. Cette phase est rapidement suivie d'une diminution de la population jusqu'à absence de la souche test dans un millilitre de lait (Boussouel *et al.*, 2000).

#### III.4. Les modèles d'études

Les milieux modèles poissons stériles sont depuis longtemps utilisés dans l'étude de l'altération des produits de la mer. Différentes techniques ont été développées dans le but de déterminer les principales causes de ce phénomène et de différencier les actions enzymatiques et bactériennes. De nombreuses techniques ont été utilisées pour obtenir la stérilité de ces modèles : réalisation d'homogénéisats de muscles avec des produits chimiques comme le toluène afin d'inhiber toute croissance bactérienne (Reed et Spence, 1929 ; Gibbons et Reed, 1930 ; Beatty et Collins, 1939), radiation ionisante (Nickerson *et al.*, 1950 ; Proctor *et al.*, 1952), utilisation d'antibiotiques (de Silva et Hughes, 1960), stérilisation par la chaleur (Castell, 1950 ; Castell et Greenough, 1957 ; Castell *et al.*, 1957 ; Castell et Greenough, 1959 ; Castell *et al.*, 1959), lavage et stérilisation du poisson avec de l'alcool (Lobben et Lee, 1968) ou du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, une solution de formol et une lampe à ultraviolets (Herbert *et al.*, 1971).

Les milieux modèles sont utilisés afin de déterminer le potentiel d'altération des différentes souches, par leur capacité à modifier les propriétés organoleptiques et physico-chimiques des produits. Trois milieux étaient utilisés pour étudier l'altération bactérienne du poisson : le jus de poisson cru stérile, le jus de poisson stérilisé par la chaleur et des blocs de muscle stérile (Dalgaard *et al.*, 1993 ; Dalgaard, 1995).

Joffraud *et al.* (1998) ont élaboré un dernier modèle stérile, mais pour le poisson fumé, qui comprend une succession de plusieurs de techniques : lavage du poisson entier avec une solution à 5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> suivi d'un abondant rinçage, découpe de la tête et de la queue, retrait des viscères, lavage de la peau avec une solution à 5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et une solution de formol à 2 %, levée des filets et retrait de la peau, rinçage avec une solution chlorée à 1 %, fumage, rinçage à l'eau distillée stérile, stockage à 4 °C, découpe des filets en cubes, congélation à - 80 °C, ionisation de 1,5 ou 3 kGy et stockage à - 80 °C. Lorsqu'il n'est pas ionisé, ce milieu reste stérile pendant une semaine mais les différences sensorielles apparaissent après quatre semaines d'incubation à 4 °C. Le niveau d'ionisation n'a pas d'incidence sur la stérilité du milieu. En effet, avec les deux niveaux d'ionisation, les milieux restent stériles après onze semaines d'incubation à 4 °C.

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

### I. Souches bactériennes, milieux de culture et méthodes microbiologiques

#### I.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude (Tableau 5) proviennent des collections publiques DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, Allemagne) et CIP (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France). Les souches sont conservées inoculées à un taux de 10 % (v/v) mais non cultivées avec 1/3 de glycérol (v/v) à -20 °C dans leur milieu de culture respectif. Avant utilisation, elles sont repiquées deux fois successivement par inoculation à un taux de 1 % (v/v) et incubées à la température optimale de croissance de la souche pendant 24 h.

| Souches bactériennes                 | Codes                  | Températures d'incubation (°C) | Milieux de culture | Origine |
|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------|---------|
| <i>Brochothrix thermosphacta</i>     | DSM 20171 <sup>T</sup> | 25                             | BHI                | Porc    |
| <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> | DSM 20730 <sup>T</sup> | 30                             | TSB-YE             | Saumon  |
| <i>Listeria monocytogenes</i>        | DSM 20600 <sup>T</sup> | 37                             | TSB-YE             | Lapin   |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>       | CIP 69.13 <sup>T</sup> | 30                             | TSB-YE             | Viande  |
| <i>Shewanella putrefaciens</i>       | CIP 80.40 <sup>T</sup> | 25                             | BHI                | Eglefin |

Tableau 5 : Souches bactériennes utilisées et provenance de la souche

<sup>T</sup> : souche type ; BHI : Brain Heart Infusion ; TSB-YE : Trypcase-Soya Broth Yeast Extract.

CIP : Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France ; DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, Allemagne.

#### I.2. Milieux de culture

Le milieu TSB-YE (Trypcase-Soya Yeast Extract en bouillon ; Biomérieux, France) permet une culture abondante des quatre souches étudiées. La composition du milieu (en g.l<sup>-1</sup>) est : Bio-trypcase, 17 ; Bio-soyase, 3 ; NaCl, 5 ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 ; glucose, 2,5 et extrait autolytique de levure, 6. Lors de certains tests, ce bouillon sera gélosé, TSA-YE, par ajout de 12 g.l<sup>-1</sup> d'agar bactériologique type A. Ce milieu peut être reconstitué en reprenant la même composition que celle du milieu commercial sans ajout de glucose. Dans ce cas, le pH est ajusté à une valeur de 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH 1 N (Labosi, France). Ces milieux sont autoclavés pendant 15 min à 120 °C. Les concentrations finales en glucose (Labosi, France) sont ajustées après autoclavage par ajout d'une solution à 300 g.l<sup>-1</sup>, préalablement

stérilisée par filtration à travers des pores de 0,22 µm de diamètre (Millex<sup>®</sup>, Irlande), afin d'obtenir des concentrations finales de 1,5, 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup>.

Le milieu BHI (Brain Heart Infusion ; Biorad, France) est prêt à l'emploi. Il est utilisé pour les cultures et la conservation de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> et de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. La composition du milieu (en g.l<sup>-1</sup>) est : cerveau de veau (infusion à partir de 200 g), 7,7 ; cœur de bœuf (infusion à partir de 250 g), 9,8 ; protéose peptone, 10 ; glucose, 2 ; chlorure de sodium, 5 et phosphate disodique, 2,5. Le pH final est de 7,4 ± 0,2. Lors de certains tests, le bouillon BHI est gélosé par ajout de 12 g.l<sup>-1</sup> d'agar bactériologique type A. L'autoclavage est réalisé à 120 °C pendant 15 min.

Le milieu modèle "poisson" a été créé à partir de filets de truites arc-en-ciel saumonées provenant de l'aquaculture GABRIEL LORRAINE (Pierre-La-Treiche, France). Ces truites sont stériles et nourries avec une alimentation à base de cantaxanthine (pour la couleur de la chair). Au moment de la pêche, elles ont trois ans et pèsent de 2 à 2,5 kg. Dès leur sortie de l'eau, les truites sont tuées et placées dans de l'eau et de la glace afin de limiter les premiers phénomènes d'altération. La tête et la queue sont d'abord découpées et les poissons sont vidés. La peau et l'intérieur du poisson sont rincés abondamment et les filets sont ensuite levés et pesés. Trois stratégies ont été mises en œuvre afin de créer un milieu modèle homogène (cf. III.2.1. de la partie Résultats et Discussion).

### I.3. Numérations bactériennes

La population bactérienne est déterminée par numérations selon la technique de suspension-dilution, sur milieu approprié après ensemencement en surface (inoculum de 50 µl) à l'aide d'un ensemenceur spirale (AES Laboratoires, France) ou après ensemencement en profondeur. Les dilutions décimales sont réalisées en Tryptone-Sel (Biokar, France). Après incubation à la température optimale de croissance de chaque souche pendant 48 h, les colonies sont dénombrées grâce à un compteur de colonies (AES Laboratoires, France). Les taux de croissance maximum ( $\mu_{\max}$ ) sont calculés au cours de la phase exponentielle de croissance selon la formule suivante :

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(Nt_1) - \ln(Nt_0)}{t_1 - t_0}$$

#### I.4. Etude physiologique des souches tests

##### I.4.1. Galeries API

Les galeries API (BioMérieux, France) sont des systèmes standardisés associant plusieurs tests biochimiques permettant l'identification de souches bactériennes. Deux types de galeries API ont été utilisées, 50 CH pour *L. monocytogenes*, *B. thermosphacta* et *C. maltaromaticum*, et 20 E pour *S. putrefaciens*.

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes et du milieu API 50 CHL Medium (Biomérieux, France) permettant l'étude de la fermentation de 49 substrats carbonés et dérivés. Durant l'incubation (48 h), la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide révélée par l'indicateur de pH du milieu.

La galerie API 20 E comporte 19 microtubes contenant des substrats déshydratés et l'API suspension Medium (Biomérieux, France).

Les galeries sont incubées pendant 24 à 48 h à la température optimale de croissance de la souche étudiée.

##### I.4.2. Antibiogrammes

Le milieu Mueller-Hinton (Biorad, France) est le milieu de référence utilisé pour tester la sensibilité des souches aux antibiotiques et aux sulfamides déposés sous forme de disques (Biorad, France). Sa composition est (g.l<sup>-1</sup>) : infusion de viande bœuf, 300 ; hydrolysate de caséine, 17,5 ; amidon, 1,5 et agar bactériologique type A, 17. Le pH final est de 7,4. Le milieu est autoclavé pendant 15 min à 121°C. Le milieu gélosé en surfusion est déposé dans les boîtes de Petri sur 4 mm d'épaisseur.

L'antibiotique est présent en concentration connue dans un disque de papier filtre. Pour une concentration en antibiotique supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI), la croissance bactérienne sera arrêtée. L'inhibition se traduira par une zone circulaire, sans croissance visible. Le diamètre de cette zone est proportionnel à la sensibilité de la souche vis-à-vis de cet antibiotique.

La souche testée est ajoutée au milieu encore liquide afin d'obtenir une concentration finale de l'ordre de  $5.10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Les disques sont déposés sur la gélose solidifiée. Afin de laisser le temps à l'antibiotique de diffuser avant de permettre aux bactéries de se développer, les cultures sont incubées à 4 °C entre 4 h et une nuit. Elles sont ensuite placées à la température

optimale de croissance de la souche testée, 25 °C pour *B. thermosphacta* et *S. putrefaciens*, 30 °C pour *C. maltaromaticum* et 37 °C pour *L. monocytogenes*. La lecture des antibiogrammes est réalisée après 24 et 48 h d'incubation.

La lecture est effectuée à l'aide d'abaques. Chaque antibiotique dispose d'un abaque qui présente le rapport entre le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque et la concentration de l'antibiotique. L'abaque permet d'évaluer la CMI et de conclure sur l'efficacité potentielle de l'antibiotique lors d'un traitement. Il s'agit de comparer la CMI aux concentrations critiques (CC) fournies par l'abaque.

#### I.4.3. Milieux sélectifs

Le milieu sélectif utilisé pour la numération de *L. monocytogenes* est le milieu PALCAM (Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Aesculine Mannitol ; Biokar, France). Sa composition en g.l<sup>-1</sup> est : peptone, 23 ; extrait de levure, 3 ; glucose, 0,5 ; amidon, 1 ; chlorure de sodium, 5 ; esculine, 0,8 ; citrate ferrique ammoniacal, 0,5 ; chlorure de lithium, 15 ; D-mannitol, 10 ; rouge de phénol, 0,08 et agar bactériologique, 10. Le milieu est autoclavé pendant 15 min à 121 °C. Le supplément de ce milieu, ajouté stérilement après stérilisation (1 ml par 500 ml de milieu), contient en g.l<sup>-1</sup> : sulfate de polymyxine B, 0,005 ; ceftazidine, 0,010 et acriflavine, 0,0025. Après ensemencement, les milieux sont incubés à 37 °C pendant 48 h.

Le milieu sélectif utilisé pour la numération de *B. thermosphacta* est le milieu STAA (Streptomycin Thallous Acetate Agar). Sa composition en g.l<sup>-1</sup> est : peptone, 20 ; extrait de levure, 2 ; hydrogénophosphate de potassium, 1 ; sulfate de magnésium, 1 ; agar, 13. Le pH est ajusté à pH 7,0 ± 0,1. Le milieu est porté à ébullition jusqu'à dissolution complète avant d'ajouter 15 g.l<sup>-1</sup> de glycérol ; il est autoclavé 15 min à 121 °C. Le milieu est ensuite refroidi à 50 °C avant d'ajouter stérilement les antibiotiques à raison de 500 mg.l<sup>-1</sup> de streptomycine et 50 mg.l<sup>-1</sup> d'acétate de thallium (les solutions d'antibiotiques auront été préparées au préalable afin d'ajouter 1 ml de chaque solution dans 500 ml de milieu). Après ensemencement, les cultures sont incubées à 25 °C pendant 48 h.

Le milieu sélectif utilisé pour la numération de *C. maltaromaticum* (MCM) prend pour base le milieu TSA-YE auquel sont ajoutés la vancomycine (3,5 mg.l<sup>-1</sup>) et la gentamicine (5,0 mg.l<sup>-1</sup>)

permettant l'inhibition des bactéries Gram-positives autres que *C. maltaromaticum* (Edima, 2005). L'acide nalidixique (20 mg.l<sup>-1</sup>) empêche la croissance de la flore bactérienne Gram-négative. L'addition d'amphotéricine permettant l'inhibition des moisissures n'a pas été jugée nécessaire, car l'incubation ne doit pas excéder deux jours à 25 °C. Le milieu est autoclavé pendant 15 min à 121 °C. Le pH est ensuite ajusté aseptiquement à pH 8,8 par ajout de NaOH 1 N. Après ensemencement, les cultures sont incubées à 25 °C pendant 48 h.

Le milieu sélectif utilisé pour la numération de *S. putrefaciens* est le milieu MIA (Medium Iron Agar (Stenberg *et al.*, 1984). Sa composition est (en g.l<sup>-1</sup>) : peptone, 20 ; extrait de viande, 3 ; extrait de levure, 3 ; citrate ferrique, 0,3 ; thiosulfate de sodium, 0,3 ; NaCl, 5 ; agar, 12. Le pH du milieu est ajusté à pH 7,4 avec une solution de NaOH 2 N. Le milieu est autoclavé pendant 15 minutes à 121 °C ; il est ensuite refroidi jusqu'à 50 °C avant d'ajouter aseptiquement 0,4 g.l<sup>-1</sup> de L-cystéine et 0,1 g.l<sup>-1</sup> de bacitracine (les solutions ont été préparées au préalable afin d'ajouter 1 ml de chacune d'elle dans 500 ml de milieu). Après ensemencement, les milieux sont incubés à 25 °C pendant 48 h.

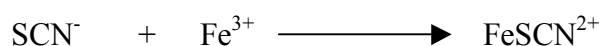
## II. Dosages chimiques et enzymatiques

### II.1. Mesure de la valeur du pH

Cette mesure est réalisée extemporanément pour toutes les expérimentations, à chaque prise d'essais. Elle est déterminée grâce au pH-mètre PHM210 (Tacussel, France).

### II.2. Dosage du thiocyanate

L'ion thiocyanate est dosé selon la méthode de Betts et Dainton (1953), fondée sur la réaction de l'anion thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) avec le nitrate ferrique (Fe<sup>3+</sup>) qui forme le complexe FeSCN<sup>2+</sup> de couleur rouge dont l'absorbance est mesurée à 460 nm.



La solution de nitrate ferrique est préparée en dissolvant 5 g de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9 H<sub>2</sub>O dans 10 ml de HNO<sub>3</sub> (2 M) ; le volume est ensuite complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

En raison de sa forte hygroscopicité, le KSCN est séché à 50 °C pendant 3 j avant utilisation.

### II.2.1. Dans un bouillon

Une gamme étalon de KSCN (Prolabo, France), de 0 à 50 mg.l<sup>-1</sup>, est préparée à partir d'une solution mère à 500 mg.l<sup>-1</sup>. Elle est réalisée deux fois à chaque expérimentation soit en tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; Merck, France/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; Labosi, France), soit en tampon citrate 0,1 M (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> ; Sigma, France/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; Merck, France), soit en TSB-YE reconstitué sans sucre. Le dosage est réalisé en mélangeant dans un puits de micro-plaque 0,1 ml d'échantillon et 0,1 ml de nitrate ferrique. L'absorbance doit être lue dans les dix minutes qui suivent le mélange. Le blanc est obtenu en remplaçant l'échantillon par du tampon ou du TSB-YE reconstitué sans sucre. La gamme étalon permettra de déterminer les concentrations en thiocyanate (Figure 4).

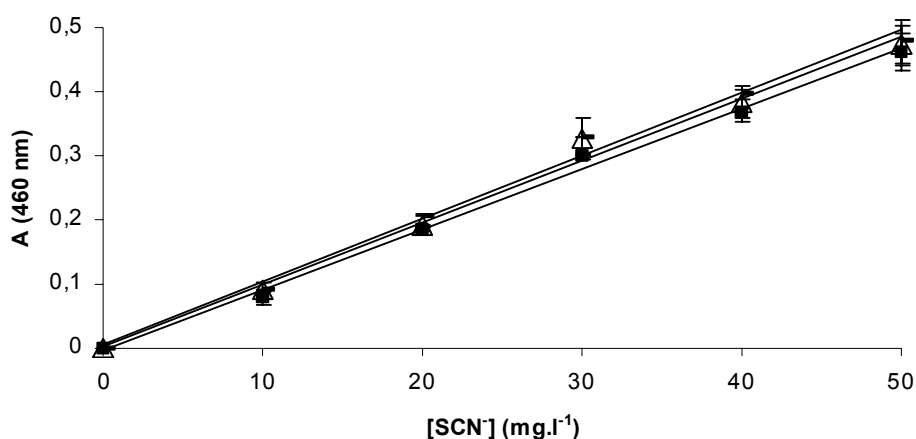


Figure 4 : Courbe d'étalonnage du thiocyanate dans les tampons citrate et phosphate et dans le milieu TSB-YE (Betts et Dainton, 1953)

Δ : dans du tampon citrate ( $A_{460\text{ nm}} = 0,00964 \times [\text{SCN}^-]$  ;  $R^2 = 0,9906$ ) ; ■ : dans du tampon phosphate ( $A_{460\text{ nm}} = 0,0094 \times [\text{SCN}^-]$  ;  $R^2 = 0,9956$ ) ; — : dans du milieu TSB-YE ( $A_{460\text{ nm}} = 0,00981 \times [\text{SCN}^-]$  ;  $R^2 = 0,9916$ ). Une gamme étalon est réalisée en double à chaque expérimentation.

### II.2.2. Dans le poisson

Le poisson et le milieu modèle « poisson » étant des milieux trop opaques pour réaliser en direct ce dosage, une méthode d'extraction du thiocyanate a dû être mise au point ; elle est fondée sur la méthode de précipitation et de dénaturation des protéines par l'acide trichloroacétique (TCA) dans le lait (Meyrand *et al.*, 1999). Ce dosage a d'abord été testé sur du poisson pour ensuite être validé dans le milieu modèle « poisson ».

Afin de réaliser une gamme étalon dans les mêmes conditions que celles des échantillons, le thiocyanate est ajouté avant le traitement par la solution de TCA (Prolabo, France).



Le taux de récupération est donné par la relation  $\left(\frac{C-C'}{C}\right) \times 100$  avec  $C$  et  $C'$  les concentrations en thiocyanate dans le surnageant lorsque ce dernier est ajouté respectivement après et avant le traitement au TCA et broyage.

L'impact de différents paramètres sur le taux de récupération du thiocyanate est étudié. Les concentrations en thiocyanate testées sont 0, 10, 20, 30, 40 et 50  $\text{mg.kg}^{-1}$ . L'influence du moment de l'ajout de la solution de TCA, avant ou après broyage de l'échantillon, est également testée, de même que celle de la concentration de la solution de TCA (5 ou 20 %, p/v) et de la dilution du poisson par cette solution (1/2, 2/3 ou 4/5). Le seuil de la méthode de dosage a été précisé. Suite à ces analyses, la méthode d'extraction du thiocyanate a été établie (cf. III.2.2. de la partie Résultats et discussion).

Cette méthode a été testée sur des filets de poisson et sur le milieu modèle. L'absorbance du surnageant à 460 nm permet de calculer la concentration en  $\text{SCN}^-$  (Figure 5).

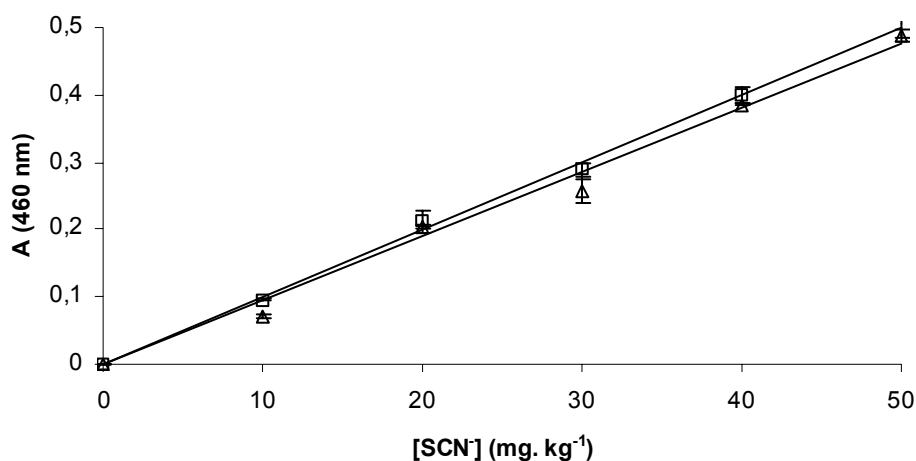


Figure 5 : Courbe d'étalonnage du thiocyanate dans du poisson et dans le milieu modèle "poisson" (d'après Betts et Dainton, 1953)

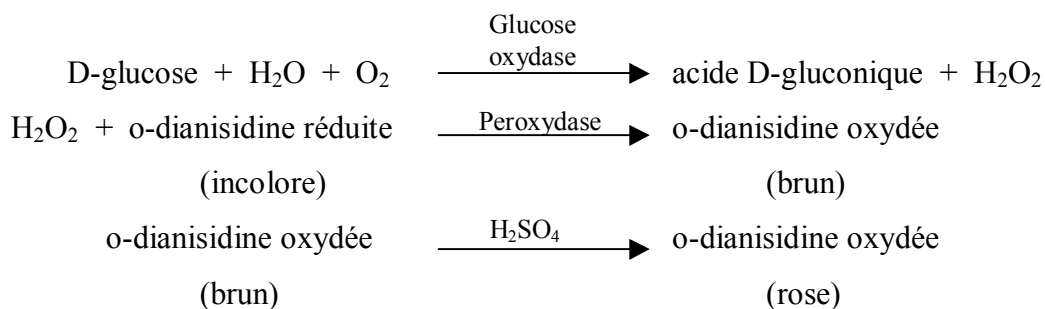
Δ : dans du poisson ( $A_{460 \text{ nm}} = 0,0095 \times [\text{SCN}^-]$  ;  $R^2 = 0,9894$ ) ; □ : dans le milieu modèle ( $A_{460 \text{ nm}} = 0,010 \times [\text{SCN}^-]$  ;  $R^2 = 0,9982$ ). Une gamme étalon est réalisée en double à chaque expérimentation.

### II.3. Dosage du peroxyde d'hydrogène

La titration est réalisée par un dosage d'oxydo-réduction. Une solution de  $\text{KMnO}_4$ , 0,1 N (0,02 M) est introduite dans la burette. Dans le bêcher, le mélange est composé de 10 ml de la solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  diluée au 1/100<sup>ème</sup>, 100 ml d'eau distillée, 50 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N. La titration est réalisée par ajout de permanganate jusqu'à l'apparition d'une coloration rose.

## II.4. Dosage du glucose

Une gamme de concentrations en glucose, comprise entre 0 et 100 mg.l<sup>-1</sup> (0 à 0,55 mM), est réalisée en double à chaque expérimentation. Le dosage du glucose est effectué grâce au kit de dosage GAGO-20 (Sigma, USA). Le produit final des réactions, l'o-dianisidine oxydée, est dosé à 540 nm.



La réaction démarre en ajoutant 100 µl du mélange glucose oxydase/péroxydase/o-dianisidine à 50 µl d'échantillon. Après 30 min d'incubation à 37 °C, la réaction est stoppée par ajout de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12 N. La coloration est stable pendant 10 min. La gamme étalon permettra de déterminer les concentrations en glucose (Figure 6).

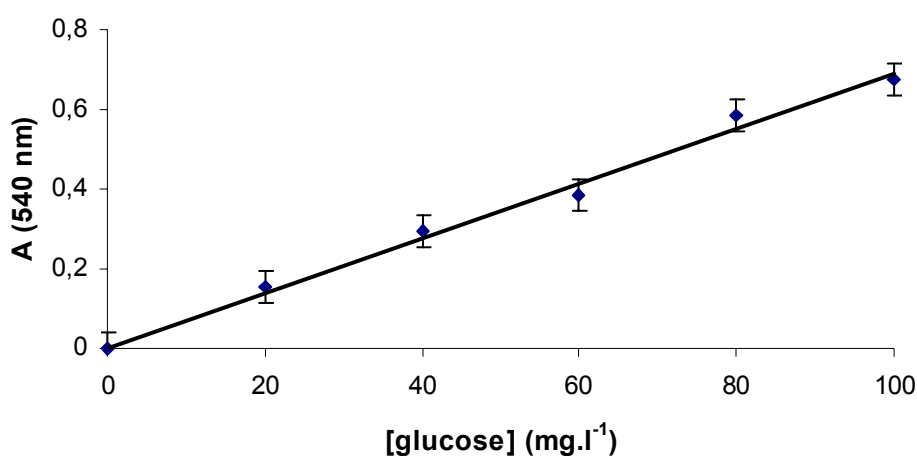


Figure 6 : Courbe d'étalonnage du glucose

Equation de la droite :  $A(540 \text{ nm}) = 0,0069.[\text{glucose}]$  ;  $R^2 = 0,9914$ . La gamme étalon est réalisée en double à chaque expérimentation.

Les enzymes utilisées dans ce kit appartiennent à la même famille que celles utilisées pour le fonctionnement du LP-s. Des tests préalables de dénaturation thermique en bain à sec (Thermoblock, FALC, Italie) ont été réalisés afin de déterminer la température d'inhibition des enzymes initialement présentes dans les échantillons. Un temps de 10 min a été choisi de manière arbitraire afin de n'avoir que le paramètre température à moduler. Les températures théoriques de dénaturation des enzymes sont respectivement de 50 et de 80 °C pour la GOD et

la LPO. Des analyses d'activités enzymatiques de la LPO et de la GOD sont réalisées sur deux lots différents de chaque enzyme pour des températures de 70, 75, 80, 85 et 90 °C ( Figure 7).

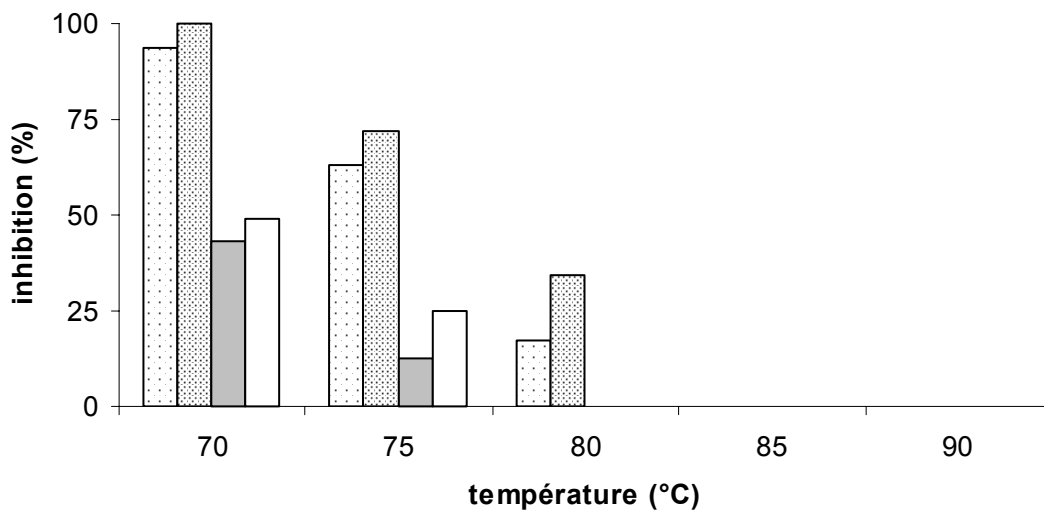
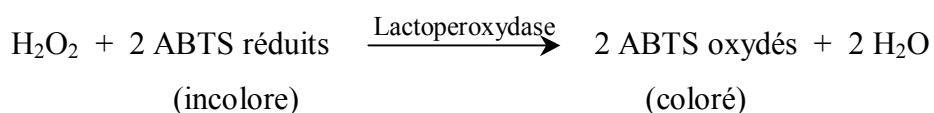


Figure 7 : Inhibition de la LPO entre 70 et 90 °C  
 ▨, LPO1 (lot n° TB297376) ; ▩, LPO2 (lot n° TB310254) ; ■, GOD1 (lot n° 6195352103) ; □, GOD2 (lot n° 617354102) .

Les enzymes dénaturées à 85 et 90 °C ont été conservées pendant quatre mois à -20 °C ; des tests d'activité enzymatique résiduelle ont été réalisés chaque mois. Après trois mois de conservation, les deux lots de LPO, inhibés à 85 °C, ont recouvré environ 10 % de leur activité. Après 4 mois de conservation, les lots de GOD et de LPO, inhibés à 90 °C, ne présentent aucune activité. L'inhibition de 90 °C pendant 10 min sera donc réalisée à chaque prise d'essai sur trois aliquots (1,5 ml par microtube, Eppendorf, Allemagne). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> résiduel présent dans les milieux de culture lors des différents essais n'interagit pas car il est éliminé lors du chauffage.

## II.5. Dosage de l'activité lactoperoxydasique

L'activité de la LPO est mesurée selon la méthode de Shindler et Bardsley (1975). Elle est suivie par spectrophotométrie en présence d'ABTS (2,2'-azino-bis (3-éthylbenz-thiazoline-6-acide sulfonique) et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La variation d'absorbance de l'ABTS, à 412 nm, est proportionnelle à la concentration de peroxyde utilisée et donc à l'activité de la LPO.



Le milieu réactionnel est composé de 2 ml d'ABTS, 1mM en tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5, de 0,021 ml de solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM et de 0,1 ml d'échantillon. L'essai à blanc est obtenu en remplaçant l'échantillon par du tampon phosphate.

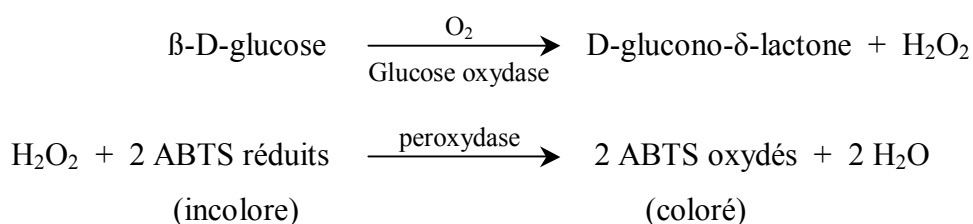
L'activité enzymatique (AE) de la lactoperoxydase se calcule comme suit (UI.l<sup>-1</sup>):

$$AE = \frac{\Delta A \times 2,121}{\epsilon \times 0,1 \times 10^3}$$

Avec  $\Delta A$ , la variation d'absorbance à 412 nm par minute, 2,121, le volume final du milieu réactionnel (ml),  $\epsilon$ , l'estimation du coefficient d'extinction molaire de (ABTS)<sub>2</sub> dans le respect des conditions stoechiométriques à 412 nm ( $1,62 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), et 0,1, le volume de la prise d'essai (ml). Une UI correspond à la réduction d'une  $\mu\text{mol}$  d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les conditions du dosage.

## II.6. Dosage de l'activité glucose oxydasique

L'activité de la glucose oxydase est dosée selon la méthode modifiée de Kreit *et al.* (1992). En présence d'oxygène, la glucose oxydase catalyse l'oxydation du  $\beta$  D-glucose en D-glucono- $\delta$ -lactone avec formation simultanée de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En présence de peroxydase, une molécule d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduite en H<sub>2</sub>O et deux molécules d'ABTS sont oxydées.



Le dosage est réalisé en introduisant successivement dans une cuve spectrophotométrique 2,2 mL de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,6, 0,02 mL d'une solution de peroxydase à 1 mg/mL en tampon phosphate, 0,1 ml d'ABTS à 0,1 M en tampon phosphate et 0,2 mL d'échantillon. L'essai à blanc est obtenu en remplaçant l'échantillon par du tampon. La variation d'absorbance à 412 nm est proportionnelle à la concentration de peroxyde d'hydrogène présente dans le milieu.

L'activité enzymatique (AE) de la glucose oxydase se calcule comme suit (UI.l<sup>-1</sup>):

$$AE = \frac{\Delta A \times 3,02}{\varepsilon \times 0,2 \times 10^3}$$

Avec  $\Delta A$ , la variation d'absorbance à 412 nm par minute, 3,02, le volume final du milieu réactionnel (ml),  $\varepsilon$ , l'estimation du coefficient d'extinction molaire de (ABTS)<sub>2</sub> dans le respect des conditions stoechiométriques à 412 nm ( $1,62 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), et 0,2, le volume de la prise d'essai (ml). Une UI correspond à la réduction d'une  $\mu\text{mol}$  de D-glucose dans les conditions du dosage.

## II.7. Indice de peroxydes

L'indice de peroxydes (Ip) correspond à la concentration de peroxyde d'hydrogène libre contenu dans une certaine masse de produit. Le principe consiste en l'addition d'une solution d'iodure de potassium à l'échantillon dissous dans le chloroforme, puis à titrer l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium (Norme NFT 60 220).

A 3 g d'échantillon, pesés à 1 mg près dans un Erlenmeyer de 250 ml, sont ajoutés 10 ml de chloroforme (Carlo Erba, France). Après une agitation rapide, 15 ml d'une solution d'acide acétique pur (Prolabo, France) et 1 ml d'une solution de KI saturée (5 g de KI pour 5 ml d'eau distillée ; Merck, France) sont ajoutés. L'Erlenmeyer doit être bouché, agité pendant une minute et laissé à l'abri de la lumière durant 5 minutes. A la fin de cette incubation, sont ajoutés 75 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'empois d'amidon (1 g pour 100 ml) qui servira d'indicateur. La titration est réalisée en agitant vigoureusement l'iode libéré avec une solution de thiosulfate de sodium 0,02 N (Merck, France).

Si l'essai à blanc excède 0,05 ml de la solution de thiosulfate de sodium, de nouveaux réactifs doivent être préparés.

L'indice de peroxyde peut être exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme de produit :

$$Ip = \frac{(V - V_0) \times N \times 100}{E}$$

Avec V, volume en ml de la solution de thiosulfate utilisée ; V<sub>0</sub>, volume en ml de la solution de thiosulfate utilisée pour le blanc ; N, normalité de la solution de thiosulfate ; E, masse en grammes de la prise d'essai. Un résultat nul sera exprimé par  $Ip < 0,25 \text{ méq} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

## II.8. Mesures de la concentration en oxygène dissous et du potentiel d'oxydo-réduction

Les mesures de la concentration en oxygène dissous et du potentiel d'oxydo-réduction (Eh) sont réalisées en fermenteur Applikon (France) de 3 l ayant les caractéristiques suivantes : cuve de 3 l Applikon, module de contrôle type Bio controller ADI 1030 (Applikon, France), agitation contrôlée par un agitateur type Stirrer controller P310 ADI 1032 (Applikon, France), chauffage par une enveloppe chauffante, circuit de refroidissement commandé par électrovanne, sonde pH à gel DPAS (Mettler Toledo, France), sonde de mesure du potentiel rédox (Mettler Toledo, France), sonde à O<sub>2</sub> dissous (Applikon, France). Les sondes à Eh et à O<sub>2</sub> dissous sont autoclavées à 121 °C pendant 15 min avec le réacteur. La sonde à oxygène doit être préparée la veille pour permettre à l'électrolyte de se charger. Avant toute manipulation, cette sonde doit être calibrée. Le 0 % de la sonde est réglé grâce à un apport d'azote ; le 100 % est réglé par un apport d'air ce qui correspond en réalité à 20 % d'oxygène.

Deux études sont réalisées afin d'étudier l'impact de l'oxygène sur le fonctionnement du LP-s : soit la teneur en oxygène dissous est maintenue tout au long de l'expérimentation (0, 5, 10, 15 et 20 %), soit elle est uniquement suivie au cours de l'incubation en absence ou en présence d'une agitation, dans ce cas la teneur initiale en oxygène dissous est de 16 %. Ces études sont mises en œuvre en absence de souche, à 25 °C, pendant 210 min, dans un volume final de 2 l de TSB-YE, stérilisés dans le réacteur comme indiqué précédemment. Les tests sont réalisés en double. Les différents constituants du LP-s sont ajoutés après la stérilisation, à l'aide de seringues stériles. Les concentrations finales du LP-s sont celles qui ont été optimisées à partir du plan d'expériences : 1,5 g.l<sup>-1</sup> (8,33 mM) pour le glucose, 3930 UI.l<sup>-1</sup> pour la LPO (25 mg.l<sup>-1</sup>), 85,5 UI.l<sup>-1</sup> pour la GOD (1,5 mg.l<sup>-1</sup>) et 50 mg.l<sup>-1</sup> (0,5 mM) de SCN<sup>-</sup>. Au cours de ces analyses seront analysées les consommations de l'oxygène dissous et du glucose, la peroxydation du thiocyanate et les variations des valeurs du pH et du potentiel d'oxydo-réduction.

## II.9. Dosage des acides gras

Afin de réaliser le dosage des acides gras, une extraction de ces derniers par la méthode méthanol/chloroforme (Bligh et Dyer, 1959 ; Rementzis et Samelis, 1996) est suivie de leur méthylation par la méthode des tubes tests (Morrison et Smith, 1964 ; Rementzis et Samelis, 1996) ce qui permettra une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Dans un tube à essai, 10 g de produit, 10 ml de chloroforme (VWR international, France) et 20 ml de méthanol (VWR international, France) sont homogénéisés à l'aide d'un vortex pendant deux minutes. Un volume de 10 ml de chloroforme est ajouté au mélange ; le contenu du tube est saturé à l'azote et homogénéisé pendant 30 s. Le mélange obtenu est filtré sur papier filtre Watman n° 1 ; le tube et le gâteau sont lavés avec 50 ml de chloroforme, 50 ml de méthanol et 50 ml d'eau distillée. Le filtrat biphasique est transféré dans une ampoule à décanter, saturé à l'azote et laissé au repos pendant au moins une heure. La phase inférieure contenant le chloroforme et les acides gras est récupérée dans un ballon contenant 5 g de sulfate de sodium anhydre ; le contenu du ballon est saturé avec de l'azote et laissé au repos à 4 °C pendant 15 min. Cette phase, transférée dans un ballon rodé, est séchée sous vide dans un évaporateur rotatif (Rotavapor Büchi RE 111, France).

Pour la suite de l'extraction, trois tubes propres, secs et pesés sont utilisés (1, 2, 3). Dans le tube 1, à 0,1 g d'acides gras sont ajoutés 1,5 ml d'hexane et 1,5 ml de BFE/méthanol à 8 % (v/v ; VWR international, France). Après une saturation à l'azote, le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex et placé à 100 °C pendant 1 h. Lorsque le mélange est refroidi à la température ambiante, 1 ml d'hexane et 2 ml d'eau sont ajoutés. Le contenu du tube est de nouveau saturé avec de l'azote, homogénéisé et placé au repos à température ambiante jusqu'à l'apparition de deux phases. La phase supérieure, placée dans le tube 2, est saturée avec de l'azote. La phase inférieure est lavée deux fois avec de l'hexane et les phases supérieures de ces lavages sont placées dans le tube 2. Au contenu du tube 2 sont ajoutés 2 ml d'eau distillée et 0,5 g de sulfate de sodium. Après un repos à température ambiante, la phase supérieure est recueillie dans le tube 3. L'hexane est éliminé de ce tube grâce à un passage sous azote. Le tube 3 est pesé et la masse obtenue est resuspendue à raison d'1 ml d'hexane par 0,1 g d'acides gras.

Sous forme d'esters méthyliques, les acides gras sont plus volatils, ce qui permet leur analyse par CPG. Celle-ci est réalisée avec un chromatographe Peri2000 (Perichrome, France) muni d'une colonne capillaire en silice fondue (longueur : 25 m ; diamètre : 0,32 mm) contenant du polyéthylène glycol et de l'acide téréphtalique, d'un détecteur FID et d'un logiciel d'intégration électronique (Winlab, Perichrome, France). Le volume d'injection est de 1 µl. Les conditions d'analyses sont : températures de l'injecteur et du détecteur de 260 °C ; température initiale du four de 70 °C, incrémentation de 40 °C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 180 °C, puis de 3 °C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 220 °C ; flux d'azote de 60 ml.min<sup>-1</sup>.

Les pics observés sont comparés à ceux de trois solutions standards contenant des acides gras : C8, C10, C12, C13, C14, C14:1Δ9, C15, C16, C16:1Δ9, C17, C18, C18:1Δ9, C18:2Δ9,12, C18:3Δ9,12,15, C20, C20:1Δ11, C22, C22:1Δ13 (Supelco, Sigma, France) ; C14, C16, C16:1Δ9, C18:1Δ9, C18:1Δ11, C18:2Δ9,12, C20:1Δ11, C18:4Δ7,9,12,15, C22:1Δ11, C22:1Δ13, C20:5Δ5,8,11,14,17, C22:5Δ8,11,14,17,19, C22:6Δ5,8,11,14,17,19 (PUFA n°1 – source marine, Interchrome, France) ; C14, C16, C16:1Δ9, C18, C18:1Δ7, C18:1Δ9, C18:2Δ9,12, C18:3Δ6,9,12, C20:3Δ8,11,14, C20:4Δ5,8,8,14, C20:5Δ5,8,11,14,17, C22:5Δ8,11,14,17,19, C22:6Δ5,8,11,14,17,19 (PUFA n°2 – source animale, Interchrome, France).

### III. Les plans d'expériences

#### III.1. Réseaux uniformes de Doehlert

Afin de déterminer les effets linéaires, les effets quadratiques et les interactions entre les différents facteurs, le choix s'est porté sur les réseaux uniformes de Doehlert (1970). Ces derniers permettent une distribution uniforme des points expérimentaux dans l'espace des facteurs normés ; ces points sont disposés suivant un réseau rhomboédrique. Ce type de distribution permet d'augmenter la qualité du modèle prévisionnel. La matrice de Doehlert permet également de choisir des niveaux distincts pour chacun des facteurs étudiés. Ainsi, le premier facteur a 3 niveaux, le deuxième 5 niveaux et tous les autres facteurs ont 7 niveaux.

Le plan d'expériences sert à sélectionner les essais qui vont permettre d'étudier une réponse Y en fonction de plusieurs facteurs X1, X2, ... Xk. Cette réponse correspond à la concentration de thiocyanate peroxydé, exprimée en mg.l<sup>-1</sup>. Les facteurs sont des grandeurs continues ou discontinues qui peuvent avoir une influence sur la réponse étudiée. Pour chaque facteur, des bornes sont déterminées pour le domaine expérimental ( $U_i \min < U_i < U_i \max$ ). Les variables sont ensuite transformées en variables centrées réduites X<sub>i</sub>, ce qui revient à normer les variables entre -1 et + 1 ( $-1 < X_i < +1$ ). Cette opération permet de simplifier le calcul matriciel ; les variables centrées réduites X<sub>ij</sub>, pour la variable j à l'expérience i, ne dépendent plus des unités des facteurs et peuvent donc être comparées entre elles. Elles sont calculées selon la formule :

$$A_{ij} = \frac{X_{ij} - A_j^{(0)}}{C_j}$$



$A_{ij}$  représente la valeur du facteur  $j$  à l'expérience  $i$ ,  $A_j^{(0)}$  la valeur du facteur  $j$  au centre du domaine expérimental et  $C_j$  le facteur de réduction ou le pas de variation du niveau du facteur.

### III.2. Conditions opératoires

Les conditions expérimentales sont déterminées à partir des expériences préalables réalisées au sein du laboratoire et de la littérature. La peroxydation du  $\text{SCN}^-$  est étudiée en fonction des concentrations en GOD ( $X_1$ , 5 niveaux, de 0,5 à 2,5  $\text{mg.l}^{-1}$ ), en LPO ( $X_2$ , 7 niveaux, de 0 à 40  $\text{mg.l}^{-1}$ ), en glucose ( $X_3$ , 7 niveaux, de 100 à 2000  $\text{mg.l}^{-1}$ ) et de la valeur du pH ( $X_4$ , 3 niveaux, de 6,0 à 7,4 ou de 4,5 à 6,7) (Tableau 6). La concentration en  $\text{SCN}^-$  est fixée à 50  $\text{mg.l}^{-1}$ . Les températures d'incubation sont 4 et 25 °C.

| Facteurs                               | Valeurs expérimentales                                     |
|--|--|
| $X_1$ : GOD ( $\text{mg.l}^{-1}$ )     | 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5                                |
| $X_2$ : LPO ( $\text{mg.l}^{-1}$ )     | 0 ; 6,67 ; 13,33 ; 20,00 ; 26,67 ; 33,33 ; 40,00           |
| $X_3$ : glucose ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) | 100 ; 337,47 ; 812,53 ; 1050,00 ; 1287,47 ; 1762,53 ; 2000 |
| $X_4$ : pH                             | 6,0 ; 6,7 ; 7,4  |
|  | 4,5 ; 5,6 ; 6,7  |

Tableau 6 : Domaine expérimental et distribution des niveaux de chaque variable retenue pour l'évaluation de la peroxydation du  $\text{SCN}^-$

La concentration en  $\text{SCN}^-$  est de 50  $\text{mg.l}^{-1}$  ; le tampon phosphate est utilisé pour les valeurs de pH comprises entre 6,0 et 7,4 ; le tampon citrate est utilisé pour les valeurs de pH comprises entre 4,5 et 6,7.

En fonction de la gamme de valeurs de pH désirées, deux tampons ont été sélectionnés : le tampon phosphate 0,1 M ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ; Merck, France/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; Labosi, France) pour des valeurs de pH proches de la neutralité (pH 6,0 ; 6,7 et 7,4) et le tampon citrate 0,1 M ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$  ; Sigma, France / $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; Merck, France) pour des valeurs de pH plus acides (pH 4,5, 5,6 et 6,7). Les solutions tampons sont autoclavées à 121 °C pendant 15 min.

Les solutions des composants du LP-s sont préparées séparément dans les tampons correspondants : LPO (lot n° TB297376, 157,1  $\text{UI.mg}^{-1}$ , BioSerae, France), 4  $\text{g.l}^{-1}$  ; GOD (lot n° 6195352103, 57  $\text{UI.mg}^{-1}$ , BioSerae, France), 0,25  $\text{g.l}^{-1}$  ; KSCN, 1,0 M (Prolabo, France) et glucose (Labosi, France), 1,11 M. Les solutions sont stérilisées par filtration à travers des pores de 0,22  $\mu\text{m}$  de diamètre (Millex<sup>®</sup>). Le volume final est de 150 ml. Les flacons sont placés dans des bains d'eau à 4 ou à 25 °C pendant 72 h d'incubation.

## III.3. Modélisation de la réponse

Si quatre facteurs sont étudiés, 21 expériences (N) sont réalisées ( $N > k^2+k+1$ ). Elles incluent trois répétitions de l'essai au centre du domaine, afin de prendre en compte l'erreur expérimentale, soit un total de 24 expérimentations (Tableau 7).

| Expérimentations | Variables                                      |  |  |                                 |                |
|------------------|--|--|--|---------------------------------|----------------|
|                  | X <sub>1</sub><br>GOD<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | X <sub>2</sub><br>LPO<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | X <sub>3</sub><br>Glucose<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) | X <sub>4</sub><br>Valeurs de pH |                |
|                  |  |  |  | Tampon phosphate                | Tampon citrate |
| 1                | 2,50   | 20,00  | 1050,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 2                | 0,50   | 20,00  | 1050,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 3                | 2,00   | 40,00  | 1050,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 4                | 1,00   | 0,00   | 1050,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 5                | 2,00   | 0,00   | 1050,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 6                | 1,00   | 40,00  | 1050,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 7                | 2,00   | 26,67  | 2000,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 8                | 1,00   | 13,33  | 100,00   | 6,70                            | 5,60           |
| 9                | 2,00   | 13,33  | 100,00   | 6,70                            | 5,60           |
| 10               | 1,50   | 33,33  | 100,00   | 6,70                            | 5,60           |
| 11               | 1,00   | 26,67  | 2000,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 12               | 1,50   | 6,67   | 2000,00  | 6,70                            | 5,60           |
| 13               | 2,00   | 26,67  | 1287,47  | 7,40                            | 6,70           |
| 14               | 1,00   | 13,33  | 812,53   | 6,00                            | 4,50           |
| 15               | 2,00   | 13,33  | 812,53   | 6,00                            | 4,50           |
| 16               | 1,50   | 33,33  | 812,53   | 6,00                            | 4,50           |
| 17               | 1,50   | 20,00  | 1762,53  | 6,00                            | 4,50           |
| 18               | 1,00   | 26,67  | 1287,47  | 7,40                            | 6,70           |
| 19               | 1,50   | 6,67   | 1287,47  | 7,40                            | 6,70           |
| 20               | 1,50   | 20,00  | 337,47   | 7,40                            | 6,70           |
| 21 à 24          | 1,50   | 20,00  | 1050,00  | 6,70                            | 5,60           |

Tableau 7 : Matrice uniforme de Doehlert pour les quatre variables, concentrations en GOD (X<sub>1</sub>), LPO (X<sub>2</sub>), glucose (X<sub>3</sub>) et valeurs de pH (X<sub>4</sub>)

Les expérimentations 21 à 24 correspondent aux trois répétitions réalisées au centre du domaine.

La réponse peut être représentée par une équation quadratique, comprenant 15 coefficients, uniquement valable sur l'ensemble du domaine expérimental.

$$Y_j = \beta_{j0} + \sum_{i=1}^4 \beta_{ji} X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{jii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{jij} X_i X_j$$

$Y_j$  représente la réponse,  $X_i$  les variables indépendantes,  $\beta_{j0}$  le terme constant,  $\beta_{ji}$  les coefficients linéaires du premier ordre,  $\beta_{jii}$  les termes carrés,  $\beta_{jij}$  les termes d'interaction. L'analyse des chemins optimaux aux différentes prises d'essais permet l'optimisation des conditions initiales d'activation du LP-s.

#### III.4. Etude des surfaces de réponses

Les résultats expérimentaux et la prédiction de la réponse sur l'ensemble du domaine expérimental peuvent être visualisés sous forme de courbes d'isoconcentrations ou d'isoréponses générées par le logiciel NEMROD<sup>®</sup> (Mathieu et Phan-Tan-Luu, 1997). Ces courbes sont définies comme des courbes de niveau de la surface de réponse ; une isoréponse est l'ensemble des points tels que la fonction  $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$  est égale à une constante. Ces isoréponses sont des portions de parabole, d'ellipse ou d'hyperbole, car le modèle postulé est quadratique. Selon le modèle étudié, il est ainsi possible de suivre l'évolution de la réponse en fonction de deux facteurs tout en fixant les autres facteurs à des valeurs constantes, prises au centre du domaine expérimental.

A partir de ces représentations graphiques, l'influence des facteurs entre eux et sur la concentration de thiocyanate peroxydé peut être déterminée. Dans le but de faciliter la compréhension de ces courbes d'isoconcentrations, trois cas sont représentés (Figure 8). Les courbes d'isoréponses correspondent à la concentration de thiocyanate consommé. Les facteurs influents peuvent être déterminés ; modifiés, ils induisent une variation significative de la réponse. Dans la représentation graphique du cas n°1, le facteur  $X_2$  est prépondérant, contrairement au facteur  $X_1$  qui n'a aucun effet sur la réponse, car l'augmentation ou la diminution de la valeur du facteur  $X_2$  favorise ou diminue la peroxydation du thiocyanate. Le cas n°2 traduit l'influence prépondérante du facteur  $X_1$  sur la réponse, tandis que le facteur  $X_2$  n'a aucune influence significative. Le cas n°3 indique une interaction entre les facteurs  $X_1$  et  $X_2$ .

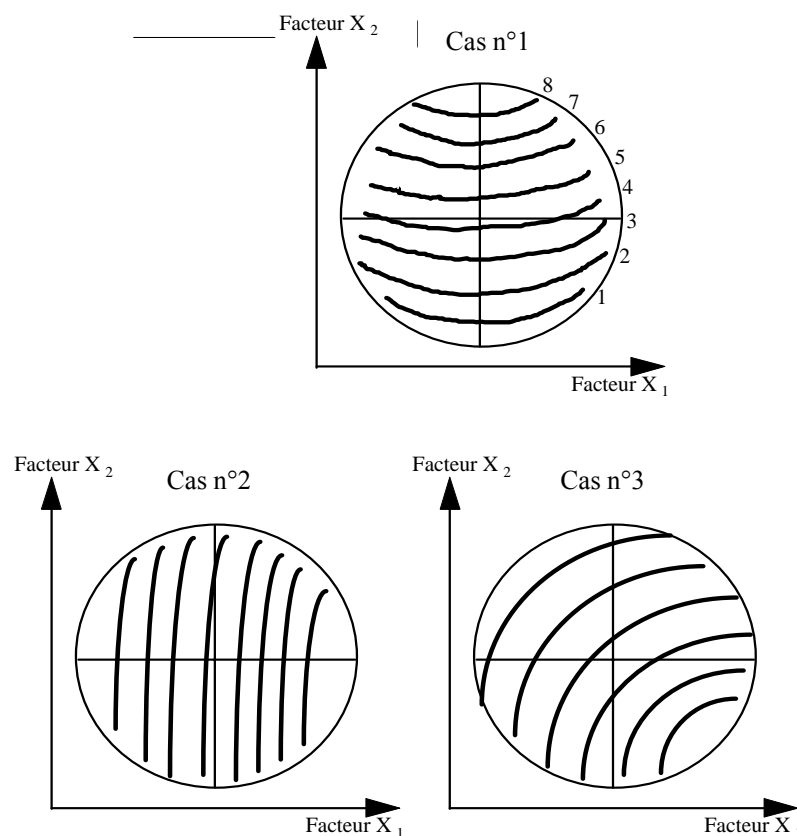


Figure 8 : Représentation schématique de courbes fictives d'isoreponses en fonction de deux facteurs ( $X_1$  et  $X_2$ ), le facteur  $X_3$  étant fixé à sa valeur centrale

Le domaine expérimental est délimité par le cercle et les courbes d'isoreponses sont représentées en gras ; elles sont repérées par un numéro qui correspond à une teneur en thiocyanate croissante

## IV. Impact du LP-s sur la croissance bactérienne

### IV.1. Comparaison de l'effet antibactérien du LP-s optimisé et du LP-s anciennement utilisé au laboratoire

Les souches *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> et *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13<sup>T</sup> sont utilisées comme souches cibles. Après trois repiquages successifs dans du TSB-YE, un dernier repiquage et les essais sont réalisés dans du lait en poudre reconstitué (10 % p/v ; Oxoid, France). Les expériences sont réalisées à 25 °C et le niveau de population initiale est de  $10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Deux LP-s sont utilisés : le système non optimisé de Boussouel *et al.* (2000), LP-sN (112,5 UI.l<sup>-1</sup> de GOD, 5040 UI.l<sup>-1</sup> de LPO, 0,2 g.l<sup>-1</sup> de glucose et 25 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup>) et le système optimisé (85,5 UI.l<sup>-1</sup> de GOD, 3930 UI.l<sup>-1</sup> de LPO, 1,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose et 50 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup>), LP-sO (Adolphe *et al.*, 2006). Le volume final est de 200 ml, réparti ensuite à raison de 15 ml par tube 220 x 20 stériles. La croissance des souches et le pH sont suivis au cours de l'incubation.

Les autres expérimentations ont été réalisées avec *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. Les concentrations optimisées du LP-s retenues à partir du plan d'expériences sont 1,5 g.l<sup>-1</sup> (8,33 mM) pour le glucose, 3930 UI.l<sup>-1</sup> pour la LPO (25 mg.l<sup>-1</sup>), 85,5 UI.l<sup>-1</sup> pour la GOD (1,5 mg.l<sup>-1</sup>) en présence de 50 mg.l<sup>-1</sup> (0,5 mM) de SCN<sup>-</sup>. Les solutions sont stérilisées par filtration à travers des pores de 0,22 µm de diamètre.

#### IV.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus petite concentration d'agent antibactérien exerçant une activité inhibitrice sur une souche. Les essais sont réalisés en triple. Le milieu de culture est le TS-YE reconstitué, sous forme liquide (TSB-YE) et solide (TSA-YE) ; le pH est ajusté à 6,5 avec NaOH 1 N (Labosi, France) ; le milieu, autoclavé pendant 15 min à 120 °C, peut être gélosé par ajout d'agar bactériologique (12 g.l<sup>-1</sup>) avant la stérilisation.

Deux types d'analyses des CMI ont été réalisés (Annexes). La première est effectuée avec le LP-s optimisé introduit à  $t = 0$  (CMI-LP-s) avec les quatre souches à une concentration initiale de  $10^4$  à  $10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Les constituants du système sont utilisés à différentes concentrations, celles optimisées mais également aux dilutions de raison 1/2 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32). Le deuxième type d'expérience est mis en œuvre avec le LP-s optimisé qui a été incubé à 25 °C jusqu'à ce que la totalité du SCN<sup>-</sup> soit consommée (CMI-OSCN<sup>-</sup>). Les mêmes dilutions de raison 1/2 sont ensuite réalisées et l'inoculation des souches est réalisée comme précédemment.

Les suspensions bactériennes sont réalisées dans des flacons pour un volume final de 200 ml de TSB-YE qui est réparti ensuite dans des tubes 220 x 20 stériles à raison de 15 ml par tube. Dans le cas de la dilution des CMI en milieu solide, la souche est incluse dans la gélose et la suspension antibactérienne est déposée à la surface de la gélose sous forme de gouttes de 5 µl ou dans des puits à raison de 20 µl.

La variation du pH, la concentration en SCN<sup>-</sup> résiduel (essais CMI-LP-s), l'absorbance à 660 nm, la consommation de glucose et la population bactérienne sont suivis pendant 296 h d'incubation à 4 °C et à la température optimale de croissance de chaque souche test.

### IV.3. Impact du LP-s sur la croissance bactérienne

Les quatre souches sont utilisées seules ou en culture mixte, le niveau de population initiale est compris entre  $10^4$  et  $10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Un témoin contenant le LP-s en absence de souches est réalisé afin d'observer son fonctionnement dans le milieu TSB-YE et le milieu modèle "poisson".

L'ajout du LP-s et les suspensions bactériennes sont réalisées dans des flacons en verre Pyrex contenant un volume final de 1000 ml qui est réparti ensuite dans des tubes 220 x 20 stériles à raison de 15 ml par tube. Les expérimentations sont conduites en triple dans le cas du TSB-YE et en double dans le milieu modèle "poisson", à 4 °C pendant 296 h.

#### IV.3.1. Etude en milieu TSB-YE

Le milieu de culture est le TSB-YE reconstitué sans ajout et avec 1,5, 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Les analyses sont réalisées à 4 °C pendant 296 h d'incubation.

La population bactérienne de chacune des souches, la variation du pH, la peroxydation du SCN<sup>-</sup> et la consommation du glucose sont suivis au cours de l'incubation.

#### IV.3.2. Etude sur milieu modèle "poisson"

Le milieu utilisé est le milieu modèle élaboré à partir de filets de truites arc-en-ciel élevées en aquaculture. Les études sont réalisées à 4 °C pendant 296 h.

La population bactérienne de chacune des souches, la variation du pH, la peroxydation du SCN<sup>-</sup>, la consommation en oxygène dissous, la variation du potentiel d'oxydo-réduction, et la consommation du glucose sont suivies au cours de l'incubation.

Une analyse de la composition en acides gras par CPG est réalisée au déclenchement ( $t_0$ ) et à l'arrêt de la manipulation (296 h d'incubation).

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

### I. Etude physiologique des souches tests

L'objectif de ce travail est de mieux connaître les quatre souches tests, d'établir leur carte d'identité, par des analyses physiologiques et des tests de sensibilité aux antibiotiques, et de valider des milieux sélectifs, commerciaux ou élaborés au sein du laboratoire, pour les numérations des souches en culture mixte.

#### I.1. Caractéristiques physiologiques

Les premières observations sont réalisées sur des colonies obtenues après isolement sur milieu TSA-YE incubé 48 h à la température optimale de croissance de la souche considérée.

*Listeria monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> se présente sous forme de colonies blanches, opaques, bombées, à bords réguliers, d'un diamètre de 2 mm. L'observation des cellules bactériennes après coloration de Gram, montre des petits bacilles Gram-positifs à bouts arrondis qui sont soit isolés, soit groupés par deux ou en courtes chaînes.

Les colonies de *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> possèdent les mêmes caractéristiques que celles de *L. monocytogenes*, mais sont plus petites (1 mm). Les petits coccobacilles Gram-positifs sont généralement isolés ou par deux.

*Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> forme des colonies blanches, arrondies, bombées, à bords réguliers et d'un diamètre moyen de 1,5 mm. Les bâtonnets Gram-positifs, petits à bouts ronds, sont groupés en général par deux (forme caractéristique en V) ou en chaînettes.

*Shewanella putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> se présente sous forme de colonies de couleur rose orangée, bombées, opaques, à bord irrégulier, d'un diamètre de 3,5 mm. Les bâtonnets à Gram-négatif, droits ou incurvés, sont en général disposés en chaînettes.

La croissance de chaque souche a été déterminée aux différentes températures optimales de croissance de chacune d'elles, 25 °C (*B. thermosphacta* et *S. putrefaciens*), 30 °C (*C. maltaromaticum*) ou 37 °C (*L. monocytogenes*), ainsi qu'à 4 °C en milieu TSB-YE (Tableau 8). Dans toutes les conditions et pour toutes les souches, les populations, atteintes en fin

d'incubation à 4 °C, sont les mêmes que celles obtenues lors d'une incubation à la température optimale de la souche considérée ; elles sont comprises entre 2 et  $6.10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> après 140 h à 4 °C ou après 24 h d'incubation à 25, 30 ou 37 °C. Les quatre souches présentent des  $\mu_{\max}$  plus importants à leur température optimale de croissance.

| Souches   | Températures d'incubation (°C) |             |             |             |
|---|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|   | 4                              | 25          | 30          | 37          |
| <i>L. monocytogenes</i> DSM 20600 <sup>T</sup>  | 0,10 ± 0,01                    | 0,71 ± 0,02 | 0,75 ± 0,02 | 0,76 ± 0,02 |
| <i>B. thermosphacta</i> DSM 20171 <sup>T</sup>  | 0,10 ± 0,01                    | 0,69 ± 0,01 | 0,64 ± 0,01 | 0,65 ± 0,02 |
| <i>C. maltaromaticum</i> DSM 20700 <sup>T</sup> | 0,10 ± 0,01                    | 0,75 ± 0,01 | 0,78 ± 0,01 | 0,77 ± 0,01 |
| <i>S. putrefaciens</i> CIP 80.40 <sup>T</sup>   | 0,11 ± 0,01                    | 0,88 ± 0,01 | 0,86 ± 0,02 | 0,86 ± 0,01 |

Tableau 8 : Taux de croissance maxima ( $\mu_{\max}$ , h<sup>-1</sup>) obtenus à 4, 25, 30 et 37 °C en milieu TSB-YE pour les souches *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>

Les profils fermentaires obtenus par l'ensemencement de galeries API 50 CH et 20 E ont permis de construire des mini-galeries permettant de vérifier rapidement la pureté de chaque souche, lors de la chaque décongélation d'un microtube du stock, et la sélectivité des milieux, en contrôlant la persistance biochimique des caractères des colonies présentes sur chacun des milieux sélectifs lors de cultures mixtes.

Ces profils de fermentation (Tableau 9) permettent de sélectionner des substrats carbonés, fermentés uniquement par une seule souche. Ainsi, le rhamnose est fermenté par *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, le L-arabinose par *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> et le mélibiose par *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup>.

Le profil de fermentation de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>, obtenu après l'ensemencement d'une galerie API 20 E (Tableau 10), permet de vérifier que cette souche Gram-négative ne fermente pas les substrats carbonés sélectionnés pour les trois autres souches ; cependant, il ne permet pas de mettre en évidence un substrat carboné spécifique permettant de vérifier la pureté de cette souche et son appartenance au genre considéré. A partir de données bibliographiques, des tests ont été réalisés sur des milieux contenant de la L-cystéine ; seule *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est capable de métaboliser ce substrat.



| Substrats carbonés           | Souches   |   |  |
|------------------------------|---|---|--|
|                              | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i><br>DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> |
| <b>L-arabinose</b>           | -   | +   | -  |
| D-arabitol                   | +   | -   | +  |
| Glycérol                     | -   | (+)   | -  |
| Inositol                     | -   | (+)   | -  |
| Lactose                      | -   | +   | +  |
| Mannitol                     | -   | +   | +  |
| Mélezitose                   | -   | (+)   | (+)  |
| <b>Mélibiose</b>             | -   | -   | +  |
| $\alpha$ -méthyl-D-glucoside | (+)   | -   | +  |
| $\alpha$ -méthyl-D-mannoside | (+)   | -   | +  |
| <b>Rhamnose</b>              | +   | -   | -  |
| Ribose                       | -   | +   | +  |
| <b>Saccharose</b>            | -   | +   | (+)  |
| Salicine                     | +   | (+)   | +  |
| Sorbitol                     | -   | (+)   | (+)  |
| Xylitol                      | +   | -   | (+)  |
| D-xylose                     | -   | (+)   | -  |
| L-xylose                     | -   | (+)   | -  |

Tableau 9 : Profils de fermentation de différents substrats carbonés obtenus après ensemencement de galeries API 50 CH

L'incubation est réalisée à la température optimale de croissance de chacune des souches *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> (37 °C), *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> (25 °C), *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> (30 °C).

+ : test positif, (+) : test faiblement positif, - : test négatif.

Les tests suivants sont négatifs pour les trois souches : 2-céto-gluconate, 5-céto-gluconate, adonitol, amidon, D-arabinose, L-arabitol, dulcitol, érythritol, D-fucose, galactose, gluconate, glycogène, inuline, D-lyxose,  $\beta$ -méthyl-D-xyloside, raffinose, sorbose, D-tagatose, D-turanose.

Les tests suivants sont positifs pour les trois souches : N-acétyl-glucosamine, amygdaline, arbutine, cellobiose, esculine, D-fructose,  $\beta$ -gentiobiose, D-glucose, maltose, D-mannose et tréhalose.

| Substrats                                   | Réponse | Substrats                     | Réponse |
|---|---------|-------------------------------|---------|
| Amygdaline                                  | -       | <b>L-rhamnose</b>             | -       |
| <b>L-arabinose</b>                          | -       | <b>D-saccharose</b>           | -       |
| L-arginine                                  | -       | Sodium pyruvate               | -       |
| Gélatine bovine                             | +       | Sodium thiosulfate            | +       |
| D-glucose                                   | +       | D-sorbitol                    | -       |
| inositol                                    | -       | Trisodium citrate             | +       |
| L-lysine                                    | -       | Tryptophane désaminase        | -       |
| D-mannitol                                  | -       | Urée                          | -       |
| <b>D-mélibiose</b>                          | -       | Production d'indole           | -       |
| 2- nitrophényl- $\beta$ D-galactopyranoside | -       | Production de NO <sub>2</sub> | +       |
| L-ornithine                                 | +       | Réduction en N <sub>2</sub>   | -       |

Tableau 10 : Profil obtenu après lecture d'une galerie API 20 E, ensemencée avec *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>

L'incubation est réalisée à 25 °C. + : test positif ; (+) : test faiblement positif ; - : test négatif.

A partir de ces résultats, une mini-galerie de fermentation carbonée permettant la différenciation des quatre souches de cette étude a pu être établie (Tableau 11).

| Substrats carbonés | Souches   |   |  |  |
|--------------------|---|---|--|--|
|                    | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i><br>DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i><br>CIP 80.40 <sup>T</sup> |
| glucose            | +   | +   | +  | +  |
| L-arabinose        | -   | +   | -  | -  |
| L-cystéine         | -   | -   | -  | +  |
| mélibiose          | -   | -   | +  | -  |
| rhamnose           | +   | -   | -  | -  |

Tableau 11 : Mini-galeries d'identification des quatre souches cibles, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>

+ : test positif, - : test négatif.

## I.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

En complément de ces galeries de fermentation, l'étude la sensibilité des souches aux antibiotiques par des antibiogrammes permet d'affiner leur carte d'identité physiologique (Tableau 12).

La céfixime et la céfoxitine n'ont aucun effet sur les souches Gram-positives mais elles inhibent la croissance de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. A l'inverse, l'amoxicilline, seule ou en association avec l'acide clavulanique, n'a d'effet antibactérien que sur les souches Gram-positives. La bacitracine et les sulfamides permettent la croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> et de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>.

*L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est la souche la plus sensible aux différents antibiotiques, avec une sensibilité à 16 antibiotiques et trois comportements intermédiaires. *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> est sensible à l'action de 15 antibiotiques et à deux comportements intermédiaires. *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> apparaît comme la souche la moins sensible des souches aux antibiotiques ; sa croissance est inhibée par 12 antibiotiques et affectée par deux antibiotiques. *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est sensible à 14 des antibiotiques testés, mais c'est la seule souche qui ne présente aucun comportement intermédiaire.

La plupart des antibiotiques agissent sur la membrane ou sur le métabolisme (Tableau 13). En comparant leurs mécanismes d'action à celui du LP-s, il est possible de prédire la sensibilité à ce système. Le LP-s entraîne des dommages au niveau de la membrane et des enzymes clés du métabolisme et de la synthèse protéique, ce qui perturbe les activités cellulaires (Mickelson, 1977 ; Thomas et Aune, 1978b ; Reiter et Härnolv, 1984 ; Reiter et Perraudin, 1991 ; Hui, 1993 ; Kussendrager et van Hooijdonk, 2000). La différence de sensibilité des quatre souches

vis-à-vis des antibiotiques n'est pas significative. D'après ces données, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> devrait présenter des sensibilités aux LP-s assez proches.

| Familles    | Sous-familles                       | Dénominations                        | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i><br>DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i><br>CIP 80.40 <sup>T</sup> |
|-------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|---|--|--|
| aminoside   |                                     | amikacine                            | *S  | I   | *S   | S  |
|             |                                     | Gentamycine, kanamycine, nétilmicine | S   | S   | S  | S  |
|             |                                     | tobramycine                          | S   | S   | *S   | R  |
| β-lactamine | céphalosporine                      | cefalotine                           | I   | I   | *S   | R  |
|             |                                     | <b>cefixime, cefoxitine</b>          | <b>R</b>  | <b>R</b>  | <b>R</b>   | <b>*S</b>  |
|             |                                     | cefoperazone                         | I   | R   | I  | *S   |
|             |                                     | cefotaxine                           | I   | R   | *R   | *S   |
|             |                                     | ceftazidine                          | R   | R   | I  | S  |
|             | penicilline A / aminopenicilline    | <b>amoxicilline</b>                  | <b>S</b>  | <b>S</b>  | <b>S</b>   | <b>R</b>   |
|             |                                     | AMX + acide clavulanique             | S   | S   | S  | R  |
|             | penicillines A / carboxypenicilline | ticarcilline                         | S   | R   | S  | *S   |
|             | penicilline G                       | penicilline G                        | S   | R   | S  | R  |
| divers      |                                     | fosfomycine, novobiocine             | R, S  | S   | *S   | R  |
|             | glycopeptide                        | teicoplanine, vancomycine            | S   | S   | R  | R  |
| macrolide   | lincosamide                         | lincomycine                          | S   | R   | R  | R  |
|             | streptogramine                      | pristinamycine                       | S   | S   | R  | *S   |
|             | streptogramine                      | erythromycine                        | R   | S   | S  | S  |
| phénicole   |                                     | chloramphenicol                      | S   | S   | S  | *S   |
| polypeptide |                                     | <b>bacitracine</b>                   | <b>R</b>  | <b>S</b>  | <b>S</b>   | <b>R</b>   |
|             |                                     | polymixine B                         | S   | R   | S  | *R   |
| quinolone   |                                     | acide nalidixique                    | R   | R   | R  | *S   |
|             | fluoroquinolone                     | ciprofloxacine, pefloxacine          | S, I  | S   | S  | S, *R  |
| sulfamide   |                                     | <b>sulfamides (SSS)</b>              | <b>S</b>  | <b>R</b>  | <b>S</b>   | <b>*S</b>  |
|             |                                     | triméthopime, triméthopime + SSS     | S   | S   | S  | S  |

Tableau 12 : Antibiogrammes obtenus après 48 h d'incubation à la température optimale de croissance des quatre souches, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>  
S : Sensible, I : Indéterminé, R : Résistant, \* : repousse.

| Familles           | Dénominations  | Mode d'action  |
|--------------------|--|--|
| aminoside          | amikacine, gentamycine, kanamycine, nétilmicine, tobramycine | Sur les bactéries aérobies et aéro-anaérobies, ces antibiotiques se fixent sur la sous-unité 30S des ribosomes de façon irréversible |
| $\beta$ -lactamine |  | Sur la synthèse de la paroi, arrêt de la synthèse de la muréine  |
| divers             | fosfomycine, novobiocine                                     | Sur la synthèse de la paroi, arrêt de la synthèse du peptidoglycane  |
|                    | teicoplanine, vancomycine                                    | Sur la paroi, empêche la fixation sur la chaîne de muréine en formation  |
| macrolide          |  | Sur la synthèse protéique, fixation en fonction de la sous-unité 50S des ribosomes   |
| phénicol           | chloramphenicol  | Sur la synthèse protéique, inhibition de la formation de la liaison peptidique   |
| polypeptide        | bacitracine  | Sur la membrane cytoplasmique des bacilles Gram-positifs, combinaison avec les phospholipides  |
|                    | polymixine B   | Sur la paroi des bactéries Gram-positives, combinaison avec les nucléotides précurseurs, empêche leur déphosphorylation              |
| quinolone          | acide nalidixique  | Sur la synthèse des acides nucléiques, blocage de l'activité de l'ADN girase   |
|                    | ciprofloxacine, pefloxacine                                  |  |
| sulfamide          | sulfamides (SSS)   | Sur la métabolisme intermédiaire, inhibition de l'acide folique  |
|                    | triméthopime, triméthopime + SSS                             |  |

Tableau 13 : Mode d'action des antibiotiques

### I.3. Validation de milieux sélectifs

Les antibiogrammes ont permis de mieux connaître chacune des souches tests mais n'ont pas permis de mettre au point de milieux sélectifs permettant de numérer sélectivement chacune des souches en mélange. Des milieux du commerce ou définis dans la littérature ont été testés. Les milieux retenus pour numérer de façon sélective une souche en culture mixte sont le milieu PALCAM pour la numération sélective de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> et le milieu STAA pour la numération sélective de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>. Ces milieux sont utilisés en contrôle qualité en industrie alimentaire pour numérer sélectivement ces micro-organismes. Le milieu MIA (Medium Iron Agar), contenant de la L-cystéine et de la bacitracine, est utilisé pour la numération sélective de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> (Stenberg *et al.*, 1984). Par ailleurs, le milieu MCM (Milieu pour *Carnobacterium maltaromaticum*), mis au point au laboratoire, est utilisé pour la numération de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> (Edima, 2005). Il est fondé sur la capacité de cette souche à pousser à des pH basiques (8,8), en présence d'acide nalidixique (20 mg.l<sup>-1</sup>), de gentamicine (5,0 mg.l<sup>-1</sup>) et de vancomycine (3,5 mg.l<sup>-1</sup>). Le milieu est très spécifique pour cette espèce, car il inhibe plus ou moins la croissance des autres espèces de ce genre et également *Enterococcus faecalis* et *L. monocytogenes*, tous deux capables de se développer à des pH fortement alcalins.

| Conditions | Souches | Milieux / températures d'incubation (°C) |
|------------|---------|--|
|------------|---------|--|

| culturales                                      |   | TSA-YE*             | PALCAM / 37         | STAA / 25           | MCM / 30            | MIA / 25            |
|---|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Cultures pures</i>                           |   | 5,6.10 <sup>8</sup> | 4,4.10 <sup>8</sup> | -                   | -                   | -                   |
| <i>L. monocytogenes</i> DSM 20600 <sup>T</sup>  |   | 7,9.10 <sup>6</sup> | 7,1.10 <sup>6</sup> | -                   | -                   | -                   |
|   |   | 4.10 <sup>4</sup>   | 5,3.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   | -                   |
|   |   | 3,5.10 <sup>2</sup> | 4,5.10 <sup>2</sup> | -                   | -                   | -                   |
|   |   | 3.10 <sup>8</sup>   | -                   | 4,6.10 <sup>8</sup> | -                   | -                   |
| <i>B. thermosphacta</i> DSM 20171 <sup>T</sup>  |   | 1,8.10 <sup>6</sup> | -                   | 1,5.10 <sup>6</sup> | -                   | -                   |
|   |   | 2,2.10 <sup>4</sup> | -                   | 2.10 <sup>4</sup>   | -                   | -                   |
|   |   | 1,6.10 <sup>2</sup> | -                   | 1,7.10 <sup>2</sup> | -                   | -                   |
|   |   | 1,8.10 <sup>8</sup> | -                   | -                   | 2,3.10 <sup>8</sup> | -                   |
| <i>C. maltaromaticum</i> DSM 20700 <sup>T</sup> |   | 4,9.10 <sup>6</sup> | -                   | -                   | 1,7.10 <sup>6</sup> | -                   |
|   |   | 7,4.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   | 5,5.10 <sup>4</sup> | -                   |
|   |   | 4,6.10 <sup>2</sup> | -                   | -                   | 2,1.10 <sup>2</sup> | -                   |
|   |   | 5,5.10 <sup>8</sup> | -                   | -                   | -                   | 4,6.10 <sup>8</sup> |
| <i>S. putrefaciens</i> CIP 80.40 <sup>T</sup>   |   | 4,6.10 <sup>6</sup> | -                   | -                   | -                   | 7,8.10 <sup>6</sup> |
|   |   | 7,4.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   | -                   | 5.10 <sup>4</sup>   |
|   |   | 4,2.10 <sup>2</sup> | -                   | -                   | -                   | 1,6.10 <sup>2</sup> |
|   |   | 4.10 <sup>4</sup>   | 4,3.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   | -                   |
| <i>Culture mixte</i>                            | <i>L. monocytogenes</i> DSM 20600 <sup>T</sup>  | 2,2.10 <sup>4</sup> | -                   | 3,1.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   |
|   | <i>B. thermosphacta</i> DSM 20171 <sup>T</sup>  | 7,4.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   | 4,2.10 <sup>4</sup> | -                   |
|   | <i>C. maltaromaticum</i> DSM 20700 <sup>T</sup> | 7,4.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   | -                   | 5,7.10 <sup>4</sup> |
|   | <i>S. putrefaciens</i> CIP 80.40 <sup>T</sup>   | 7,4.10 <sup>4</sup> | -                   | -                   | -                   | -                   |

Tableau 14 : Comparaison des numérations obtenues sur milieu TSA-YE et sur milieux sélectifs pour les quatre souches, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>

Les niveaux de population initiaux sont de 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup> et 10<sup>8</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>. Les tests ont été réalisés en double.

- : niveau de population inférieur à 1 ufc.ml<sup>-1</sup> ;\* : la numération sur TSA-YE est obtenue pour chaque souche après incubation à la température optimale de croissance utilisée pour le milieu sélectif correspondant.

La sélectivité de ces milieux a été testée sur des cultures pures et des cultures mixtes, associant ces quatre souches à différentes populations initiales (Tableau 14). Les numérations obtenues sur ces milieux sélectifs ont été comparées à celles obtenues sur le milieu témoin TSA-YE. Les différences dans les niveaux de population sont dans tous les cas inférieures à 0,5 unité log<sub>10</sub>. Ces milieux sélectifs permettent donc d'inhiber les souches non désirées mais pas la souche sélectionnée.

## Résumé

Des tests biochimiques fondés sur la fermentation du glucose (pour les quatre souches), du rhamnose (*L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>), du L-arabinose (*B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>), du mélibiose (*C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup>) et de la L-cystéine (*S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>) permettent de vérifier la pureté des souches. Les antibiogrammes ont permis d'affiner la carte d'identité des souches tests. *L.*

*monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est la souche la plus sensible aux antibiotiques, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> est celle qui est la moins sensible. Trois milieux sélectifs commerciaux ont été testés. Ils sont spécifiques et non inhibiteurs de la croissance de la souche à sélectionner en cultures pures et en cultures mixtes associant ces quatre souches dans différentes proportions. Le milieu PALCAM permet la numération sélective de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, le milieu STAA celle de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>. Le milieu MCM, créé au sein du laboratoire, est utilisé pour la numération sélective de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et le milieu MIA pour celle de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>.

## II. Etude du fonctionnement du LP-s

Dans la littérature, le choix des concentrations des différents constituants du LP-s n'est pas toujours explicite. Dans certains cas, les activités spécifiques de la GOD et de la LPO ne sont pas précisées. Par ailleurs, des interactions existent entre les différents composants du LP-s. L'activité optimale de la LPO dépend de la présence d'une concentration suffisante en SCN<sup>-</sup> car une concentration insuffisante entraîne une inactivation réversible de l'enzyme. Son activité est également dépendante de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, car un excès de ce substrat aboutit à deux formes de LPO oxydées, une inactivée de manière irréversible et une autre inactivée de manière réversible (Kohler et Jenzer, 1989 ; de Witt et van Hooydonk, 1996). L'activité de la GOD est inhibée par le glucose et/ou par l'acide gluconique et par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nicol et Duke, 1966 ; Miron *et al.*, 2004). Par ailleurs, son activité est constamment "contaminée" par une activité catalasique.

Cette partie porte sur l'étude du fonctionnement du LP-s en vue d'optimiser son activité antibactérienne. Une analyse des interactions entre les différents composants va permettre de mieux appréhender son fonctionnement. L'utilisation de plans d'expériences permet d'étudier l'impact des rapports de concentrations entre la LPO, la GOD et le glucose, ainsi que de la valeur du pH sur la peroxydation du SCN<sup>-</sup>. Les meilleures conditions de fonctionnement du système seront définies afin d'optimiser la peroxydation du SCN<sup>-</sup>. Ces analyses ont été réalisées dans deux tampons différents, le tampon citrate 0,1 M (pH 4,5, 5,6 et 6,7) et le tampon phosphate 0,1 M (6,0, 6,7 et 7,4) afin de couvrir une large gamme de valeurs de pH. Ces analyses sont réalisées en milieu tampon afin d'étudier tous les mécanismes et les réactions qui ne sont dus qu'au fonctionnement du LP-s. L'emploi d'une matrice alimentaire,

plus complexe, impliquerait des interactions avec les composants de cette dernière qui fausseraient l'étude du fonctionnement du LP-s seul.

Un des points clé du fonctionnement du LP-s est la disponibilité de l'oxygène. Cependant aucune donnée n'existe dans la littérature relative à l'impact de ce substrat. Cette étude sera réalisée en milieu TSB-YE, en réacteur à teneur en oxygène contrôlée. Toutes les expériences seront réalisées en triple. Une comparaison de l'effet inhibiteur du LP-s optimisé et du LP-s anciennement utilisé au sein du laboratoire sur la croissance de *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> et de *P. fluorescens* CIP 6913<sup>T</sup> sera réalisée et permettra de valider l'optimisation du LP-s.

### II.1. Activités enzymatiques de la glucose oxydase et de la lactoperoxydase

Les activités des deux enzymes du LP-s ont été testées dans les deux tampons utilisés lors des plans d'expérience, à 4 et à 25 °C pour des valeurs de pH variant de 4,5 à 7,4 (Tableau 15).

A pH 6,7, l'analyse des résultats permet de conclure qu'il n'y a pas d'effet significatif de la nature du tampon (citrate ou phosphate) sur les activités enzymatiques de la GOD (respectivement 85,5 et 85,6 UI.l<sup>-1</sup>) et de la LPO (respectivement 4390,0 et 4352,5 UI.l<sup>-1</sup>).

| Enzymes | Température (°C) | Valeurs de pH (nature du tampon) |               |                 |               |                 |                 |
|---------|------------------|----------------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|
|         |                  | 4,5 (citrate)                    | 5,6 (citrate) | 6,0 (phosphate) | 6,7 (citrate) | 6,7 (phosphate) | 7,4 (phosphate) |
| GOD     | 25               | 244,5 ± 3,6                      | 244,5 ± 3,6   | 87,1 ± 3.0      | 85,5 ± 3,3    | 85,6 ± 2.9      | 88,1 ± 3.0      |
|         | 4                | ND                               | ND            | 84,5 ± 3.1      | ND            | 83,0 ± 3.0      | 85,6 ± 3.3      |
| LPO     | 25               | 3982,5 ± 62,5                    | 4390,0 ± 72,5 | 4530,0 ± 77.5   | 4390,0 ± 47,5 | 4352,5 ± 67.5   | 3077,5 ± 62.5   |
|         | 4                | ND                               | ND            | 1780,0 ± 47.5   | ND            | 1797,5 ± 52.5   | 1282,5 ± 52.5   |

Tableau 15 : Activités enzymatiques (UI.l<sup>-1</sup>) de la GOD et de la LPO mesurées en tampons phosphate et citrate à différentes valeurs de pH, à 25 et à 4 °C

ND : Non Déterminé.

Pour l'activité de la GOD, aucune différence significative n'est observée à 4 et à 25 °C en tampon phosphate pour des valeurs de pH de 6,0, 6,7 et 7,4. Cette activité est trois fois plus élevée aux valeurs acides de pH, 4,5 et 5,6 (244,5 UI.l<sup>-1</sup>). Haouz *et al.* (2001) ont montré que la GOD est active sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7, avec un optimum à 5,5 et nos résultats indiquent une valeur de pH optimum similaire.

L'activité enzymatique de la LPO est très affectée par la température, car elle est 60 % plus faible à 4 qu'à 25 °C. Cette activité est faiblement modifiée par les variations de pH sauf lorsqu'il est de 4,5 ou de 7,4, valeurs pour lesquelles les pertes d'activité sont respectivement de 12 et de 30 %. Ces résultats concordent avec ceux de Reiter *et al.* (1976), de Wever *et al.* (1982) et de Hernandez *et al.* (1990) qui ont observé l'activité optimale de la lactoperoxydase pour des valeurs de pH comprises entre 5 et 6,5.

## II.2. Impact de la GOD, de la LPO, du glucose et de la valeur du pH sur la peroxydation du thiocyanate

### II.2.1. Analyses de la peroxydation du thiocyanate

La teneur en  $\text{SCN}^-$  résiduel a été mesurée à intervalles réguliers pendant 72 h d'incubation dans les différentes conditions expérimentales du plan d'expériences, à 4 et 25 °C. Une comparaison entre ces différentes conditions est possible pour toutes les expériences du plan mais ne sera exploitée dans cette partie qu'au centre du domaine expérimental ( $\text{SCN}^-$ , 50  $\text{mg.l}^{-1}$  ; GOD, 85,5  $\text{UI.l}^{-1}$  ; LPO, 3140  $\text{UI.l}^{-1}$  ; glucose, 1050  $\text{mg.l}^{-1}$  avec un pH initial de 5,6 en tampon citrate et de 6,7 en tampon phosphate, à 4 et à 25 °C).

En tampon phosphate, à pH 6,7, la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  est plus rapide à 25 qu'à 4 °C (Figure 9). Au cours des cinq premières heures d'incubation, la peroxydation est de 2,2  $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  à 25 °C à pH 6,7, de 0,9  $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  à 4 °C à pH 6,7 et à 25 °C à pH 5,6. Au cours des 20 premières heures d'incubation, la peroxydation est quasiment la même à 25 °C à pH 5,6 qu'à 4 °C à pH 6,7 ; à 20 h d'incubation, la concentration totale de  $\text{SCN}^-$  peroxydé est la plus importante à 25 °C à pH 6,7. Après 30 h d'incubation, la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  est ralentie, environ 0,5  $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  à pH 6,7 à 4 et à 25 °C et 0,02  $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  à 25 °C à pH 5,6.



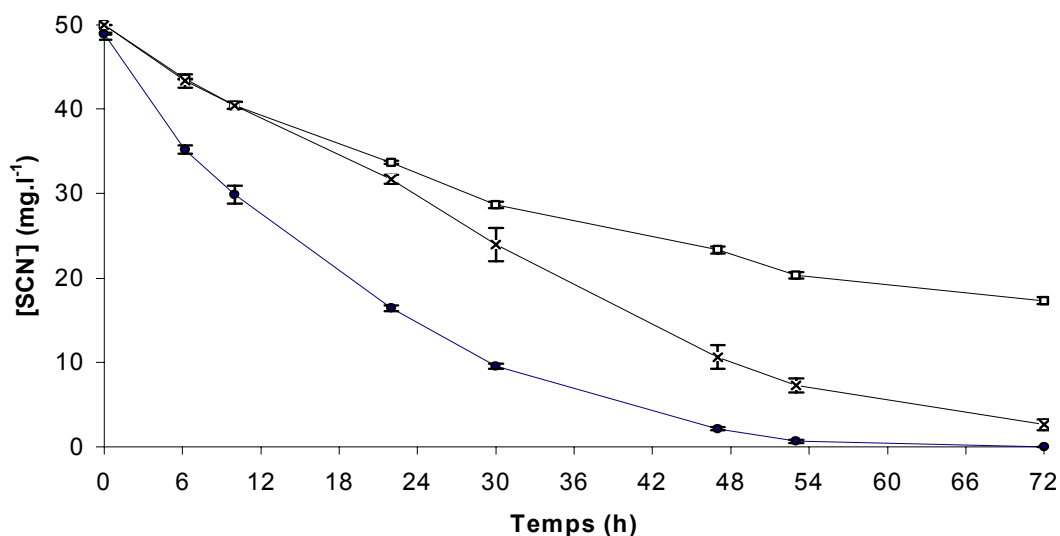


Figure 9 : Analyses de peroxydation du  $\text{SCN}^-$  à 4 et à 25 °C en tampon phosphate à pH 6,7 ou en tampon citrate à pH 5,6

La concentration initiale en thiocyanate est de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  ; les autres composants du LP-s sont à leur valeur correspondant au centre du domaine expérimental testé par la méthode RSM : GOD,  $85,5 \text{ UI.L}^{-1}$  ; LPO,  $3140 \text{ UI.L}^{-1}$  ; glucose,  $1050 \text{ mg.l}^{-1}$ , à 4 et à 25 °C. X, tampon phosphate à pH 6,7 à 4 °C ; ●, tampon phosphate à pH 6,7 à 25 °C ; ■, tampon citrate à pH 5,6 à 25 °C.

Les temps d'incubation de 5 et 30 h seront sélectionnés pour l'analyse des résultats obtenus par l'étude des surfaces de réponses (Response Surface Methodology, RSM). Cinq heures d'incubation correspondent à la vitesse initiale de la peroxydation du  $\text{SCN}^-$ . Au de-là de 30 h d'incubation, le système commence à être ralenti, et peut être en défaut de substrats ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$  et/ou  $\text{SCN}^-$ ).

### II.2.2. Quantification de l'impact des différents facteurs

L'impact des différents facteurs, LPO, GOD, glucose et valeurs de pH, sur la peroxydation du  $\text{SCN}^-$ , est donné par une équation polynomiale (Tableau 16). Les coefficients précédés d'un signe négatif indiquent qu'une augmentation du facteur correspondant diminue la réponse et donc l'efficacité inhibitrice du LP-s.

Les termes constants ( $\beta_0$ ) sont plus élevés après 30 qu'après 5 h d'incubation. Ces observations montrent que le LP-s est encore actif après 30 h d'incubation. C'est en tampon phosphate à 25 °C que la valeur de  $\beta_0$  est la plus importante, donc que la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  est maximale.

| Facteurs             | Termes       | Tampon phosphate |          |          |           | Tampon citrate |           |
|----------------------|--------------|------------------|----------|----------|-----------|----------------|-----------|
|                      |              | 4 °C             |          | 25 °C    |           | 25 °C          |           |
|                      |              | 5 h              | 30 h     | 5 h      | 30 h      | 5 h            | 30 h      |
|                      | $\beta_0$    | 10,345*          | 29,245*  | 13,697 * | 39,34 *   | 6,395 *        | 21,352 *  |
| GOD                  | $\beta_1$    | 2,107°           | 5,262*   | 1,695 *  | 4,604 *   | 0,037          | 2,231 *   |
| LPO                  | $\beta_2$    | 4,255*           | 8,191*   | 4,081 *  | 11,64 *   | 1,779 *        | 8,626 *   |
| Glucose              | $\beta_3$    | 5,879*           | 16,765*  | 3,826 *  | 12,819 *  | 1,991 *        | 7,849 *   |
| pH                   | $\beta_4$    | -0,803°          | -2,844*  | 0,425°   | -2,637 *  | -0,338 *       | -0,903 *  |
| GOD <sup>2</sup>     | $\beta_{11}$ | 0,220°           | -3,825°  | -1,775 * | -0,595°   | -1,010 *       | -2,288 *  |
| LPO <sup>2</sup>     | $B_{22}$     | -5,380*          | -17,513* | -9,012 * | -20,976 * | -3,574 *       | -5,244 *  |
| Glucose <sup>2</sup> | $\beta_{33}$ | -1,830°          | -9,760*  | -1,125 * | -7,206 *  | 0,904 *        | -5,978 *  |
| pH <sup>2</sup>      | $\beta_{44}$ | 0,298°           | 0,434°   | 3,185 *  | 4,384 *   | -1,200 *       | -0,260°   |
| GOD.LPO              | $\beta_{12}$ | 4,042°           | 3,707°   | 0,456°   | 0,058 °   | 1,137 *        | 12,073 *  |
| GOD.glucose          | $\beta_{13}$ | 0,437°           | -2,615°  | -3,082 * | -14,019 * | -0,592 *       | -4,281 *  |
| LPO.glucose          | $\beta_{23}$ | -1,821°          | -5,070°  | -2,11 *  | -3,495 *  | -1,568 *       | -6,61 *   |
| GOD.pH               | $\beta_{14}$ | 0,059°           | 5,475°   | 3,33 *   | 6,621 *   | -4,165 *       | -12,271 * |
| LPO.pH               | $\beta_{24}$ | 0,170°           | -4,876°  | -3,993 * | -6,409 *  | -2,039 *       | -4,453 *  |
| Glucose.pH           | $\beta_{34}$ | 6,631°           | 4,340°   | 3,746 *  | 5,334 *   | 2,249 *        | 0,905 *   |
| R <sup>2</sup>       |              | 0,856            | 0,889    | 0,788    | 0,773     | 0,829          | 0,749     |
| R <sup>2</sup> A     |              | 0,631            | 0,716    | 0,458    | 0,419     | 0,562          | 0,360     |

Tableau 16 : Valeurs des coefficients obtenus pour les quatre variables après 5 et 30 h d'incubation à 4 et à 25 °C : concentrations en GOD ( $X_1$ ), en LPO ( $X_2$ ), en glucose ( $X_3$ ) et valeurs de pH ( $X_4$ )

La réponse est donnée par la peroxydation du thiocyanate ; elle est analysée après 5 et 30 h d'incubation en tampon phosphate ou citrate 0,1 M à 4 et à 25 °C. Ecart de confiance: °, < 95 % ; \*, >95 %.

Les valeurs de  $\beta_0$  et des coefficients de chaque facteur ( $\beta_i$ ) sont de 20 à 50 % plus élevées pour la gamme de pH de 6,0 à 7,4 que pour la gamme de pH de 4,5 à 6,7. Le système est donc significativement plus efficace lorsque la valeur de pH est proche de la neutralité, ce qui correspond aux essais réalisés en tampon phosphate aux pH de 6,0, 6,7 et 7,4. Or précédemment lors de l'analyse des activités enzymatiques, aucune influence de la nature du tampon n'avait été relevée. Ces mesures avaient été faites en prenant les enzymes séparément, la GOD seule et la LPO seule avec un ajout initial d' $H_2O_2$ . Lorsque le système est complet, la

nature du tampon a une influence sur la peroxydation du  $\text{SCN}^-$ , le tampon phosphate permettant la meilleure activité.

Les valeurs des coefficients constants ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  et  $\beta_4$ ) indiquent que les deux facteurs ayant le plus d'impact sur la réponse sont la LPO et le glucose, quelles que soient la nature du tampon et/ou la température d'incubation. En tampon phosphate à 4 °C, le glucose est le facteur prépondérant. Il détermine la concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit et donc la concentration de  $\text{SCN}^-$  peroxydée. De plus, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut aussi oxyder le  $\text{SCN}^-$  ce qui corrobore les résultats de de Witt et van Hooydonk (1996).

La LPO est le second facteur qui interagit le plus avec la réponse. Les différences entre 4 et 25 °C en tampon phosphate sont significatives. Ce résultat est justifié car l'activité de cette enzyme est 60 % plus faible à 4 qu'à 25 °C. L'impact de la LPO en tampon citrate tout au long de l'incubation est du même ordre de grandeur que celui observé en tampon phosphate à 4 °C. Lorsque tous les éléments du LP-s sont réunis, la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  à 4 °C représente 49 % de celle à 25 °C. Pour ces analyses, réalisées en triple, les analyses statistiques montrent que la différence d'inhibition observée est significative. Une inhibition partielle de l'activité de la LPO seule a été notée à 4 °C, mais elle est diminuée lorsque l'enzyme agit au sein du LP-s.

La production d'acide gluconique par le LP-s n'a pas d'action significative sur la valeur du pH dans les conditions expérimentales étudiées. En 72 h d'incubation, une variation de 0,2 unité de pH a été notée. Dans la gamme choisie, les valeurs du pH ont un faible effet sur la réponse. Cet impact augmente lorsque la durée d'incubation augmente et il est plus important en tampon phosphate qu'en tampon citrate.

La GOD exerce un faible impact positif sur la peroxydation. A 5 h d'incubation, cet effet est quasiment nul en tampon citrate à 25 °C ; après 5 et 30 h d'incubation en tampon phosphate, il est identique à 4 et à 25 °C. En tampon citrate, les conditions expérimentales sont plus proches de la gamme de pH optimal de l'activité enzymatique de la GOD, soit 5,5, (Haouz *et al.*, 2001). Plus les conditions expérimentales se rapprochent de cette gamme de pH, moins la GOD seule a d'impact sur la peroxydation ; en tampon phosphate à 4 °C, cet impact est de 2,107 et 5,262 à 5 et 30 h d'incubation ; à 25 °C, il est de 1,695 et 4,604 à 5 et 30 h, et en tampon citrate à 25 °C, il est de 0,037 et 2,231 à 5 et 30 h.

A 4 °C, les valeurs des coefficients des interactions ( $\beta_{ij}$ ) ne sont pas significatives à 95 %. A 25 °C et après 30 h d'incubation, les interactions GOD/glucose sont plus importantes en tampon phosphate (pH 6,0, 6,7 et 7,4) qu'en tampon citrate (pH 4,5, 5,6 et 6,7) contrairement aux interactions GOD/LPO. Les interactions GOD/pH sont positives sur la réponse en tampon phosphate (+ 6,621) mais sont négatives et deux fois plus importantes en tampon citrate (- 12,271).

La GOD seule n'a qu'une très faible influence sur la peroxydation du  $\text{SCN}^-$ , mais toutes les interactions qui ont un impact significatif sur la peroxydation incluent la GOD. La GOD est un élément central du LP-s par sa production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et par toutes ses régulations. L'activité de la GOD est inhibée par le glucose et/ou l'acide gluconique et par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nicol et Duke, 1966 ; Miron *et al.*, 2004). L'activité de cette enzyme est constamment contaminée par une activité catalasique (Reiter *et al.*, 1964 ; Wolfson et Sumner, 1993). Dans un premier temps, cette dernière favorise l'action de la GOD qui augmente ainsi le taux de production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ensuite, cette augmentation induit une désactivation proportionnelle de la catalase qui décroît l'activité de la GOD (Miron *et al.*, 2004).

Les courbes d'isoréponses sont établies en fixant deux des paramètres au centre de leur domaine d'expérimentation (Figure 10). Tous les points placés sur une même courbe d'isoréponse ont la même valeur. La Figure 10a indique que la variation de la concentration en GOD n'a pas de réel impact sur la peroxydation du  $\text{SCN}^-$ . Lorsque la concentration en LPO augmente jusqu'à 29  $\text{mg.l}^{-1}$ , la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  est plus importante jusqu'à devenir totale. Cependant si cette concentration de 29  $\text{mg.l}^{-1}$  est dépassée, la concentration de  $\text{SCN}^-$  peroxydé diminue jusqu'à 36,88  $\text{mg.l}^{-1}$ . Sur la Figure 10b, l'absence d'impact de la GOD est retrouvée. De la même manière que pour la LPO, une augmentation de la concentration en glucose dès 1100 et jusqu'à 2200  $\text{mg.l}^{-1}$ , permet d'augmenter la peroxydation jusqu'à ce qu'elle soit totale, dès 1050  $\text{mg.l}^{-1}$  en glucose. La Figure 10c indique une action synergique du glucose et de la LPO sur la réponse, le maximum de peroxydation du  $\text{SCN}^-$  (totale) étant observé pour des concentrations en LPO comprises entre 17 et 32  $\text{mg.l}^{-1}$  et pour des concentrations en glucose supérieures à 1050  $\text{mg.l}^{-1}$ . L'action du pH est presque nulle, lorsque la concentration en LPO est inférieure à 15  $\text{mg.l}^{-1}$  (Figure 10d). Au delà de cette concentration, la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  diminue quand la valeur du pH augmente au-delà de 6,7.

Ces graphes sont utiles pour visualiser les interactions entre deux facteurs sur la réponse mais il faut les utiliser conjointement avec les équations polynomiales afin de bien analyser le fonctionnement du système complet dans son ensemble.

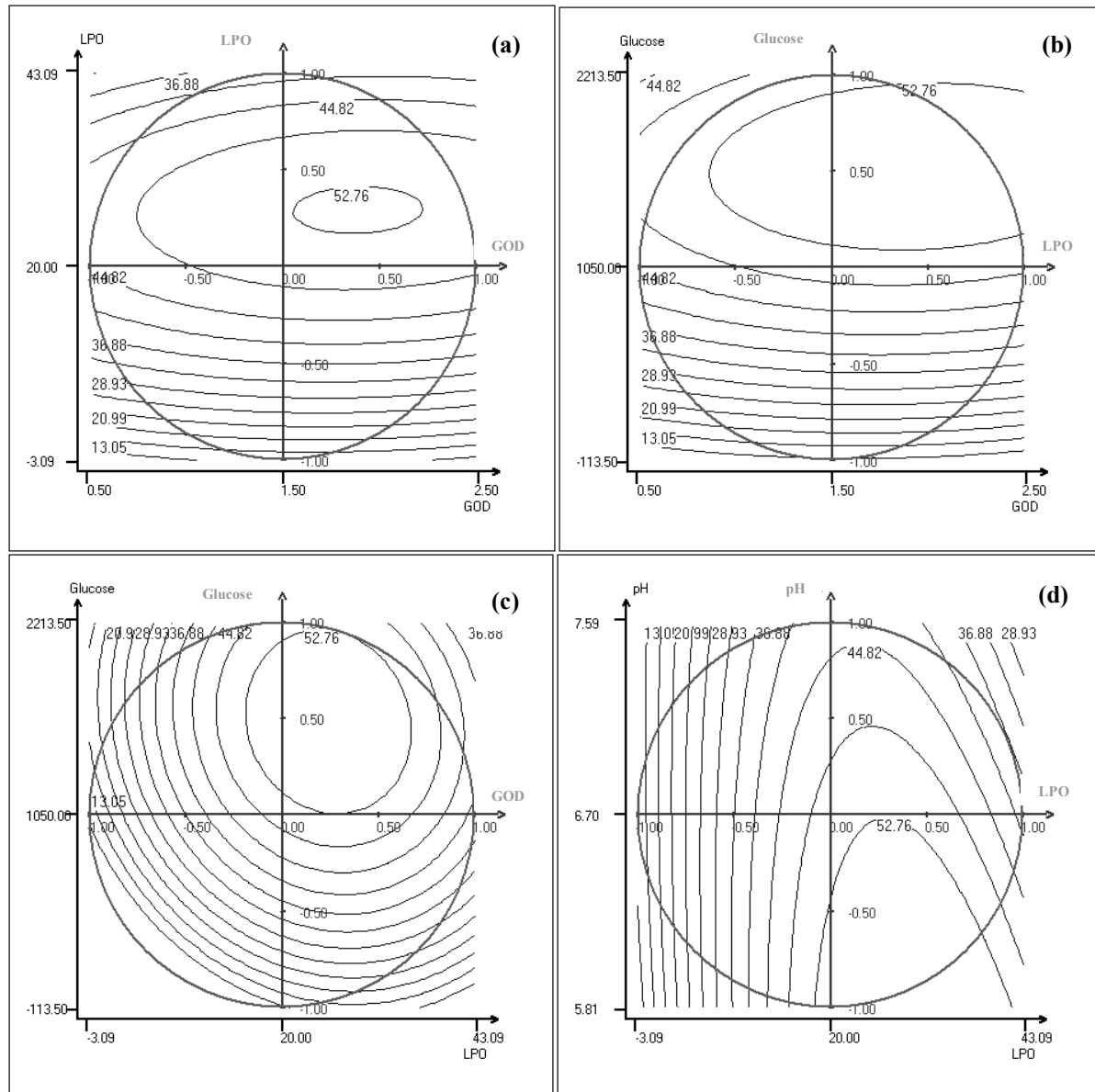


Figure 10 : Impact, à 25 °C en tampon phosphate après 30 h d'incubation, de deux paramètres, les deux autres étant fixés au centre du domaine d'expérimentation

Domaine d'expérimentation : GOD, 0,5 à 2,5  $\text{mg.l}^{-1}$  ; LPO, 0 à 40  $\text{mg.l}^{-1}$  ; glucose, 100 à 2000  $\text{mg.l}^{-1}$  ; pH, 6,0 à 7,4. Centre du domaine d'expérimentation : GOD, 1,5  $\text{mg.l}^{-1}$  (85,6  $\text{UI.l}^{-1}$ ) ; LPO, 20  $\text{mg.l}^{-1}$  (4352,5  $\text{UI.l}^{-1}$ ) ; glucose, 1050  $\text{mg.l}^{-1}$  ; pH, 6,7.

## II.3. Détermination des conditions optimales du fonctionnement du LP-s

L'optimisation des composants du LP-s est réalisée par l'analyse des chemins optimaux (Figure 11). Afin de bien détailler cette analyse, l'exemple des chemins optimaux obtenus en tampon phosphate à 25 °C après 30 h d'incubation a été retenu.

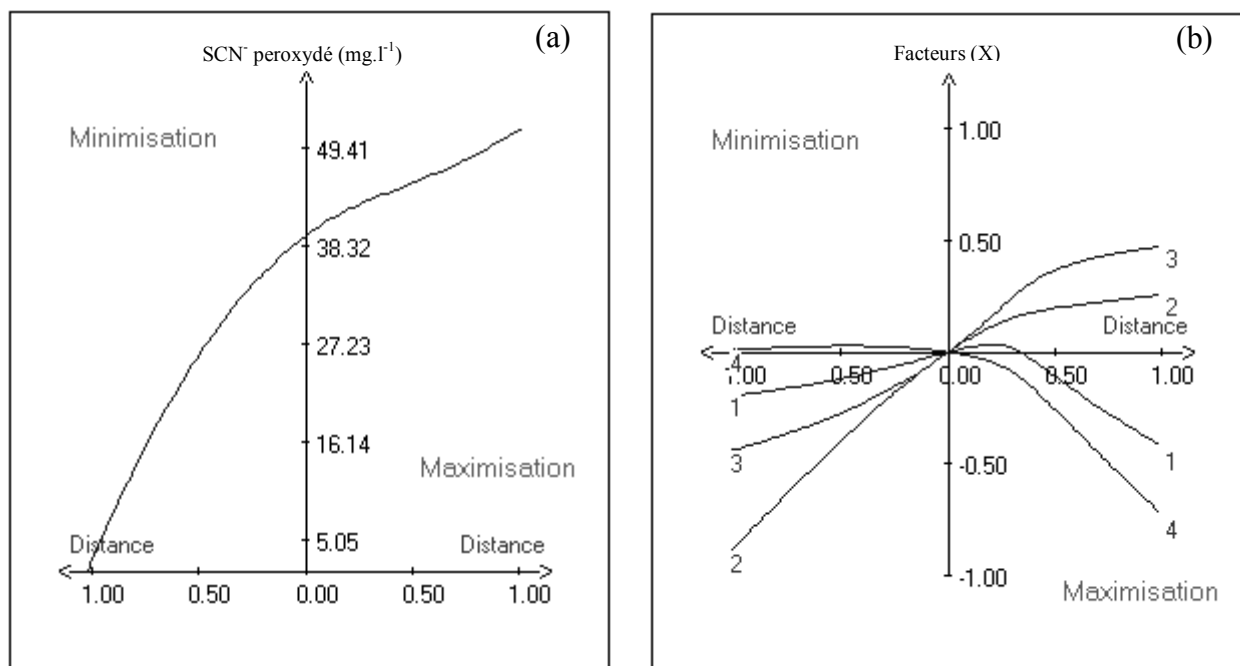


Figure 11 : Optimisation des concentrations du LP-s en tampon phosphate 0,1 M à 25 °C après 30 h d'incubation avec une concentration initiale en  $\text{SCN}^-$  de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ , en utilisant la matrice de Doehlert

a, chemin optimal du  $\text{SCN}^-$  peroxydé ; b, chemins optimaux des différents facteurs pris simultanément :  $X_1$ , concentrations en GOD, 28,5 à  $142,5 \text{ UI.l}^{-1}$  ;  $X_2$ , concentrations en LPO, 0 à  $6284 \text{ UI.l}^{-1}$  ;  $X_3$ , concentrations en glucose, 0,1 à  $2 \text{ g.l}^{-1}$  et  $X_4$ , valeurs de pH, 6,0 à 7,4. Sur l'axe "facteur", les valeurs 1,00 et -1,00 représentent les extrémités du domaine de chaque facteur. La valeur 0,00 est le centre du domaine expérimental. Tous les plans (en tampon phosphate à 4 et 25 °C et en tampon citrate à 25 °C) ont été réalisés en triple.

Lorsque la valeur de l'axe "distance" est de +1,00, tout le thiocyanate ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) est peroxydé (Figure 11a). Les valeurs -1,00 et 1,00 sur l'axe des ordonnées "facteur" représentent les extrémités du domaine de chaque facteur et 0,00 représente le centre du domaine expérimental :  $85,5 \text{ UI.l}^{-1}$  pour la GOD ( $X_1$ ),  $3142 \text{ UI.l}^{-1}$  pour la LPO ( $X_2$ ),  $1050 \text{ mg.l}^{-1}$  pour le glucose ( $X_3$ ), et 6,7 pour la valeur du pH ( $X_4$ ). L'optimisation est obtenue lorsque la valeur de 1,00 sur l'axe "distance" est atteinte (Figure 11a) et les concentrations optimales sont ensuite ajustées (Figure 11b). Pour donner un exemple d'optimisation, la valeur de  $X_1$  (GOD) doit être diminuée d'environ 40 % par rapport au centre du domaine afin d'obtenir une peroxydation maximale. Les valeurs de  $X_1$  varient entre 28,5 et  $142,5 \text{ UI.l}^{-1}$  et le centre du domaine est fixé à  $85,5 \text{ UI.l}^{-1}$  ; ainsi la concentration optimisée de  $X_1$  est de 62,7

UI.l<sup>-1</sup>. La même analyse est réalisée pour chaque facteur pour ces conditions expérimentales. La peroxydation maximale du thiocyanate est obtenue avec des concentrations de 62,7 UI.l<sup>-1</sup> pour la GOD (X<sub>1</sub>, 40 % plus faible que le centre du domaine), 3990 UI.l<sup>-1</sup> pour la LPO (X<sub>2</sub>, 27 % plus élevé par rapport au centre du domaine) et 1,6 g.l<sup>-1</sup> pour le glucose (X<sub>3</sub>, 46 % au-dessus du centre du domaine) avec une valeur de pH initiale de 6,2 (X<sub>4</sub>, 75 % en dessous du centre du domaine).

Une analyse similaire est effectuée pour chaque durée d'incubation, entre 5 et 47 h (Tableau 17).

Les concentrations optimisées en GOD sont plus élevées à 4°C en tampon phosphate ainsi qu'à 25 °C en tampon citrate que celles obtenues en tampon phosphate à 25 °C. La valeur du pH optimum est un peu plus faible en tampon phosphate à 25 °C. Aucune différence significative n'est notée en ce qui concerne les concentrations optimales en glucose et en LPO.

| Facteurs                          | Tampons   | Températures (°C) | Temps (h) |        |        |        |        |
|-----------------------------------|-----------|-------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
|                                   |           |                   | 5         | 10     | 22     | 30     | 47     |
| [GOD]<br>(UI.l <sup>-1</sup> )    | phosphate | 4                 | 102,6     | ND     | 102,6  | 96,9   | 102,6  |
|                                   |           | 25                | 96,9      | 85,5   | 74,1   | 62,7   | 68,4   |
|                                   | citrate   | 25                | 91,2      | 96,9   | 102,6  | 91,2   | 102,6  |
| [LPO]<br>(UI.l <sup>-1</sup> )    | phosphate | 4                 | 3799,4    | ND     | 3532,5 | 3658,1 | 3862,2 |
|                                   |           | 25                | 3611      | 4129,1 | 4097,7 | 3987,8 | 3925   |
|                                   | citrate   | 25                | 3689,5    | 3673,8 | 3563,9 | 3987,8 | 3909,3 |
| [Glucose]<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | phosphate | 4                 | 1,55      | ND     | 1,51   | 1,59   | 1,55   |
|                                   |           | 25                | 1,59      | 1,56   | 1,49   | 1,59   | 1,49   |
|                                   | citrate   | 25                | 1,44      | 1,48   | 1,52   | 1,51   | 1,48   |
| Valeur de<br>pH                   | phosphate | 4                 | 6,8       | ND     | 6,7    | 6,7    | 6,6    |
|                                   |           | 25                | 6,2       | 6,1    | 6,3    | 6,2    | 6,2    |
|                                   | citrate   | 25                | 6,3       | 6,3    | 6,4    | 6,5    | 6,7    |

Tableau 17 : Valeurs des concentrations en GOD, LPO, glucose et valeurs de pH pour une optimisation du LP-s en tampons phosphate et citrate à 4 et à 25 °C, pour les différentes durées d'incubation entre 5 et 47 h d'incubation

ND: Non Déterminé.

La moyenne entre les différentes conditions expérimentales et tous les temps de prélèvements permettent de déterminer les conditions pour le fonctionnement optimisé du LP-s : 85,5 UI.l<sup>-1</sup>

pour la GOD, 1,5 mg.l<sup>-1</sup> pour le glucose et 3930 UI.l<sup>-1</sup> pour la LPO avec une valeur initiale de pH initial de 6,5.

La comparaison entre les conditions d'optimisation trouvées et la littérature est délicate car la pureté des différentes enzymes et le niveau de la contamination de la GOD par l'activité catalasique ne sont pas mentionnés. Les concentrations des composants du LP-s varient largement selon la source bibliographique ou bien ne sont pas précisées (Tableau 3, I.3. de la revue bibliographique).

Dans le lait de vache, la concentration en LPO est de 30 mg.l<sup>-1</sup> (Reiter et Härnolv, 1984 ; Kussendrager, 1994). Cette concentration en LPO est proche de celle obtenue après l'optimisation réalisée précédemment (environ 25 mg.l<sup>-1</sup>) ainsi que celles citées dans la littérature. Dionysius *et al.* (1992), Bosch *et al.* (2000), Boussouel *et al.* (2000), Revol-Junelles *et al.* (2001) et Mc Lay *et al.* (2002) utilisent des concentrations en LPO supérieures à la concentration optimisée soit respectivement, 14000 UI.l<sup>-1</sup>, 30 mg.l<sup>-1</sup>, 5040 UI.l<sup>-1</sup>, 4970 UI.l<sup>-1</sup> et 187,5 mg.l<sup>-1</sup>. A l'inverse, Kennedy *et al.* (2000) et Dufour *et al.* (2003) emploient de plus faibles concentrations, 19 et 0,5 mg.l<sup>-1</sup> ; comme les activités des enzymes ne sont pas précisées, les comparaisons ne sont pas possibles. Dans l'article de Denis et Ramet (1989), la concentration pour la LPO est plus faible (20 mg.l<sup>-1</sup>) mais l'activité enzymatique est plus élevée (8000 UI.l<sup>-1</sup>).

Les concentrations en GOD mentionnées dans la littérature sont supérieures à celle obtenue dans cette expérimentation sauf dans le cas de l'étude conduite par Revol-Junelles *et al.* (2002) où elle est de 42 UI.l<sup>-1</sup> ; elles varient de 100 UI.l<sup>-1</sup> (Dionysius *et al.*, 1992 ; Bosch *et al.*, 2000) à 984 UI.l<sup>-1</sup> (Kennedy *et al.*, 2000).

Les concentrations en glucose retenues par Boussouel *et al.* (2000), Revol-Junelles *et al.* (2001) et Dufour *et al.* (2003) sont plus faibles que celles du LP-s optimisé, respectivement 0,2, 0,2 et 0,013 g.l<sup>-1</sup>. Celles des autres auteurs sont supérieures, de 2,60 à 19,59 g.l<sup>-1</sup> (Denis et Ramet, 1989 ; Dionysius *et al.*, 1992 ; Bosch *et al.*, 2000 ; Kennedy *et al.*, 2000 ; McLay *et al.*, 2002).

Les concentrations en SCN<sup>-</sup> sont comprises entre 2,24 et 500 mg.l<sup>-1</sup> (Denis et Ramet, 1989 ; Dionysius *et al.*, 1992 ; Bosch *et al.*, 2000 ; Boussouel *et al.*, 2000 ; Kennedy *et al.*, 2000 ; Revol-Junelles *et al.*, 2001 ; McLay *et al.*, 2002 ; Dufour *et al.*, 2003). La concentration de SCN<sup>-</sup> naturellement présente dans le lait de vache est de 15 mg.l<sup>-1</sup> (Reiter et Perraudin, 1991 ; Kussendrager, 1994).



En comparant les ratios substrat/enzyme (glucose/GOD, SCN<sup>-</sup>/LPO), seul le LP-s utilisé par Denis et Ramet (1989) est quasiment similaire à celui du système optimisé. Toutes les expériences ont été menées en milieu de laboratoire ou dans du lait, mais jamais dans du tampon. Cette condition peut interférer avec le bon fonctionnement du LP-s. Les essais réalisés par Kennedy *et al.* (2000) et MacLay *et al.* (2002) sont réalisés à pH 7,8, valeur qui n'est pas comprise dans les gammes de valeurs de pH optimales des activités de la GOD et de LPO. A l'inverse, Bosch *et al.* (2000) travaillent à pH 5,0 ce qui peut aussi être défavorable. Seuls Denis et Ramet (1989) et Kennedy *et al.* (2000) travaillent à des températures de 4 et 15 °C.

#### II.4. Comparaison de l'impact du LP-s optimisé, LP-sO, et du LP-s utilisé préalablement au laboratoire, LP-sN, sur la croissance de *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> et *P. fluorescens* CIP 6913<sup>T</sup>

L'effet antibactérien du LP-s optimisé a été testé contre deux souches cibles en milieu lait écrémé reconstitué à 25 °C, en comparaison avec les travaux préalablement réalisés au laboratoire (Figure 12).

Dans le lait, en absence de LP-s et à 25 °C, le pH est stable à une valeur de 6,4 et *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> a une croissance rapide, de  $2,4 \cdot 10^4$  à  $4,3 \cdot 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup> en 24 h. Les deux systèmes ont un effet bactériostatique sur la croissance de cette souche. Néanmoins, le LP-s optimisé augmente l'effet bactériostatique, qui passe de 48 h à 72 h ; après 96 h d'incubation, le niveau de population est de  $1,4 \cdot 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup> pour le LP-s utilisé par Boussouel *et al.* (2000), LP-sN, et de  $1,0 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup> pour le système optimisé, LP-sO. En présence des systèmes lactoperoxydasiques, les valeurs de pH diminuent de 6,5 à 6,2.

En absence de LP-s, *P. fluorescens* CIP 69.13<sup>T</sup> croît de  $4,2 \cdot 10^3$  à  $1,1 \cdot 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup> en 24 h. En présence du LP-sN, une faible bactériostase est observée pendant 12 h, puis la croissance reprend pour atteindre un niveau de population de  $4,2 \cdot 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup> dès 36 h d'incubation. Le LP-sO exerce un effet bactéricide ; de 24 h et jusqu'à 96 h d'incubation, la population de *P. fluorescens* CIP 69.13<sup>T</sup> est inférieure à 1 ufc.ml<sup>-1</sup>.

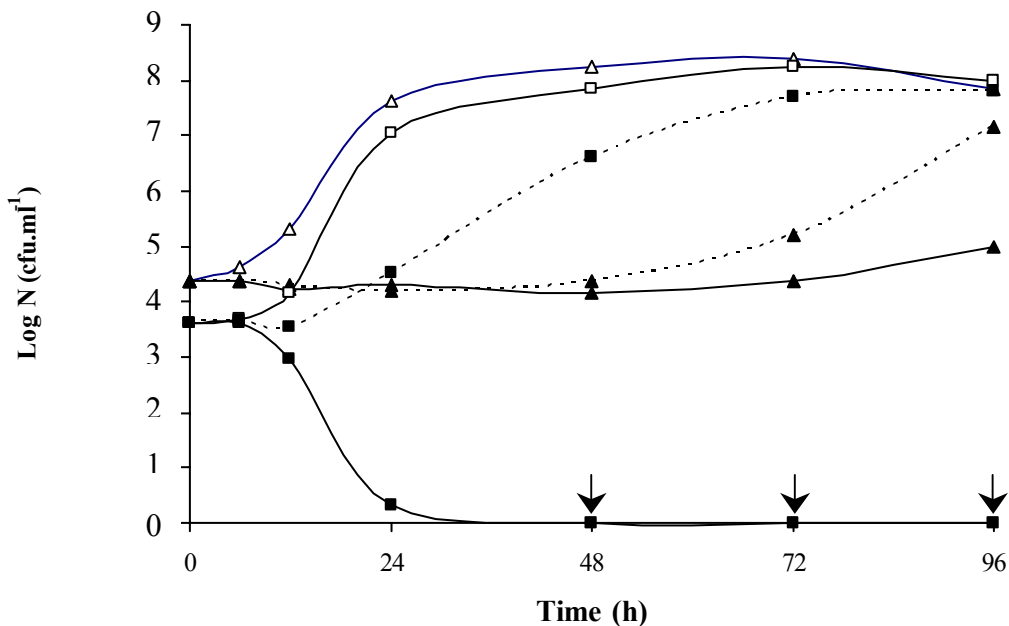


Figure 12 : Comparaison de l'efficacité antibactérienne du LP-sN et du LP-sO vis-à-vis de *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> et de *P. fluorescens* CIP 69.13<sup>T</sup> à 25 °C dans du lait reconstitué à 10 % (p/v)

Deux LP-s sont utilisés : le LP-sN, le système non optimisé de Boussouel *et al.* (2000 ; 112,5 UI.l<sup>-1</sup> de GOD, 5040 UI.l<sup>-1</sup> de LPO, 0,2 g.l<sup>-1</sup> de glucose et 25 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup>) et le LP-sO, notre système optimisé (85,5 UI.l<sup>-1</sup> de GOD, 3930 UI.l<sup>-1</sup> de LPO, 1,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose et 50 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup>).

*L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup> sans LP-s (▲), avec le LP-sN (▲), avec le LP-sO (▲).

*P. fluorescens* CIP 69.13<sup>T</sup> sans LP-s (◻), avec le LP-sN (◻), avec le LP-sO (◻).

▼, niveau de population inférieur à 1 ufc.ml<sup>-1</sup>.

## Résumé

L'activité spécifique de la GOD n'est pas influencée par une basse température, telle que 4 °C. Elle est presque trois fois plus importante à des valeurs de pH inférieures à 6,0. Ces activités dépendantes de la valeur du pH sont en accord avec celles montrées par Haouz *et al.* (2001). L'activité spécifique de la LPO est affectée, jusqu'à 30 % de perte, par les valeurs de pH de 4,5 et 7,4, ce qui corroborent les résultats exposés par Reiter *et al.* (1976), Wever *et al.* (1982) et Hernandez *et al.* (1990). Une température de 4 °C décroît de manière élevée cette activité, avec 60 % de perte.

Les réseaux de Doehlert ont permis d'analyser le fonctionnement du LP-s dans son ensemble, d'étudier les interactions entre les différents facteurs et de quantifier leur impact sur la peroxydation du SCN<sup>-</sup> (Figure 13). La LPO et le glucose sont les facteurs qui ont le plus d'impact sur la peroxydation du SCN<sup>-</sup>. Toutes les interactions avec la GOD influencent très significativement cette réponse. Ce résultat est en rapport avec les

inhibitions que cette enzyme subit par ses propres produits, l'acide gluconique et l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L' $\text{H}_2\text{O}_2$  est un élément clé du fonctionnement du système car, en fonction de sa concentration, il peut inhiber les deux enzymes du système.

La littérature rapporte des conditions opératoires fort différentes pour les différents constituants du LP-s. Ceci complique et/ou rend impossible la comparaison des résultats entre eux. Cette étude a permis, grâce aux plans d'expériences, une optimisation des concentrations des différents composants du système afin d'obtenir la peroxydation maximale du  $\text{SCN}^-$  en milieu tampon. Le LP-s optimisé, désormais utilisé pour tout le reste de l'étude, est composé de  $85,5 \text{ UI.l}^{-1}$  de GOD, de  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose, de  $3930 \text{ UI.l}^{-1}$  de LPO et à une valeur de pH initial de 6,5. La concentration en  $\text{SCN}^-$  est de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ .

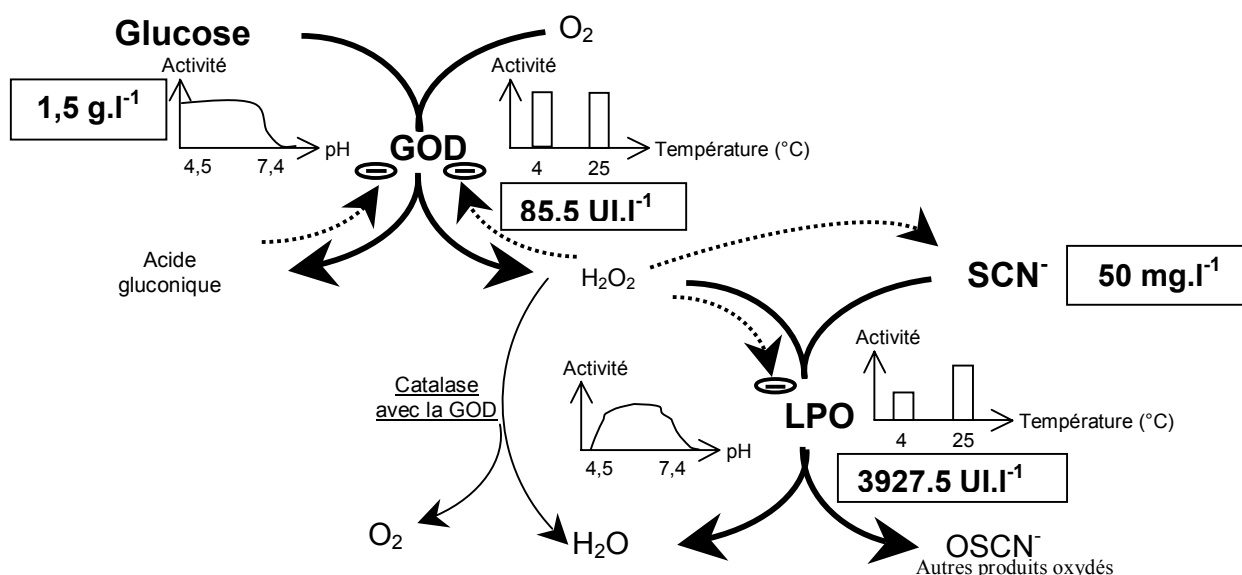


Figure 13 : Fonctionnement et régulation du LP-s

GOD, glucose oxydase ; LPO, lactoperoxydase ;  $\text{SCN}^-$  : thiocyanate ;  $\rightarrow$ , sens de la réaction ;  $\rightarrow \ominus$ , sens de l'inhibition.

Le LP-sO possède une meilleure efficacité antibactérienne que le LP-sN, mais cette activité est dépendante de la souche test. Dans le cas de *L. monocytogenes* CIP 82110<sup>T</sup>, l'effet bactériostatique est allongé de 24 h. Pour *P. fluorescens* CIP 69.13<sup>T</sup>, le LP-sO a un effet bactéricide dès les premières 24 h d'incubation.

La combinaison appropriée des concentrations des différents composants du LP-s amplifient l'effet antibactérien, soit en augmentant la durée de la bactériostase soit en inhibant totalement la croissance de la souche cible.

## II.5. Effet de l'oxygène dissous sur le fonctionnement du LP-s optimisé

L'impact de l'oxygène dissous sur le fonctionnement du LP-s optimisé a été testé à 25 °C, en réacteur, en milieu TSB-YE et en l'absence de souche test. Deux conditions ont été expérimentées : soit les teneurs en oxygène dissous sont maintenues tout au long de l'expérimentation à des valeurs constantes de 0, 5, 10, 15 et 20 %, soit sa teneur initiale n'est pas modifiée (16 %) mais la manipulation a été conduite en statique ou en agitation. Ces expériences sont réalisées sur une courte durée (210 min) à 25 °C, dans le but d'observer les vitesses initiales de variation des différents paramètres, oxygène dissous, glucose, peroxydation du thiocyanate et les variations des valeurs du pH et du potentiel d'oxydo-réduction.

Lorsque la teneur en oxygène est maintenue à une valeur fixe (0, 5, 10, 15 et 20 %), le bullage de l'air est considéré comme une agitation ; celle-ci favorise les contacts entre les enzymes et les substrats. Sans ajout d'oxygène, la teneur initiale en oxygène dissous est de 16 %, mais cette valeur n'est pas maintenue constante.

Au cours de ces différentes expérimentations, quelles que soient les conditions expérimentales, les valeurs du pH diminuent de manière constante, de 0,025 u.h<sup>-1</sup> au cours des 4 premières heures d'incubation à 25 °C ; cette acidification correspond à la production par le LP-s d'acide gluconique.

La consommation en oxygène dissous, en absence du maintien de la teneur en oxygène dissous à une valeur constante (teneur initiale de 16 %), est fonction de la présence ou de l'absence d'une agitation (Figure 14). Elle est de 0,22 %.min<sup>-1</sup> en présence d'une agitation et de seulement 0,05 %.min<sup>-1</sup> en condition statique. En agitation, l'oxygène dissous n'est plus détecté par la sonde après 90 minutes d'incubation. Lorsque la teneur en O<sub>2</sub> dissous est maintenue à une valeur fixe tout au long de l'expérimentation, cette valeur n'est pas modifiée (résultats non montrés).

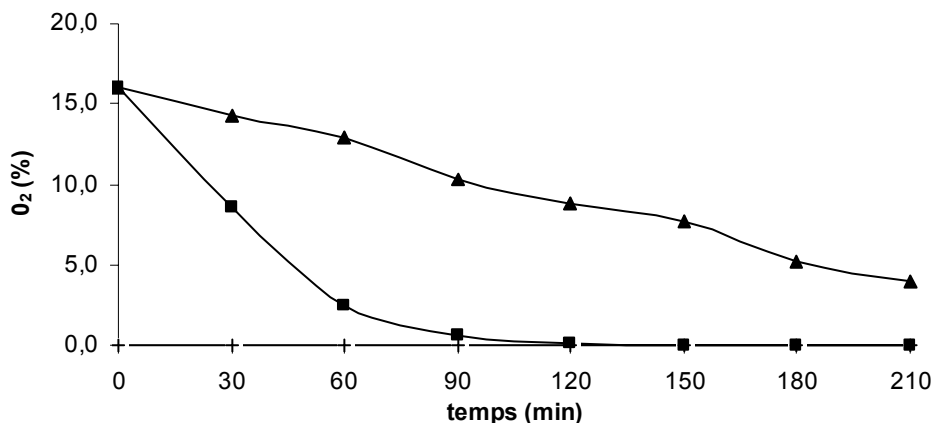


Figure 14 : Consommation de l'oxygène dissous en réacteur en présence du LP-s optimisé à 25 °C et en absence de souche, en milieu TSB-YE

Les essais ont été réalisés en double. Conditions initiales avec (■) ou sans agitation (▲).

La consommation en glucose varie en fonction de la valeur de la teneur en oxygène dissous fixée (Figure 15 a et b). Pour des teneurs de 5, 10, 15 et 20 % en O<sub>2</sub>, les consommations en glucose après 90 min d'incubation sont respectivement de 0,15 g.l<sup>-1</sup>, 0,59 g.l<sup>-1</sup>, 0,76 g.l<sup>-1</sup> et 0,96 g.l<sup>-1</sup>. Lorsque les teneurs en oxygène sont de 10 et de 15 %, une diminution de la vitesse de consommation du glucose est observée à partir de 120 min ; cette diminution est observée en 30 min lorsque la teneur est maintenue à 20 %. L'agitation accélère l'oxydation du glucose.

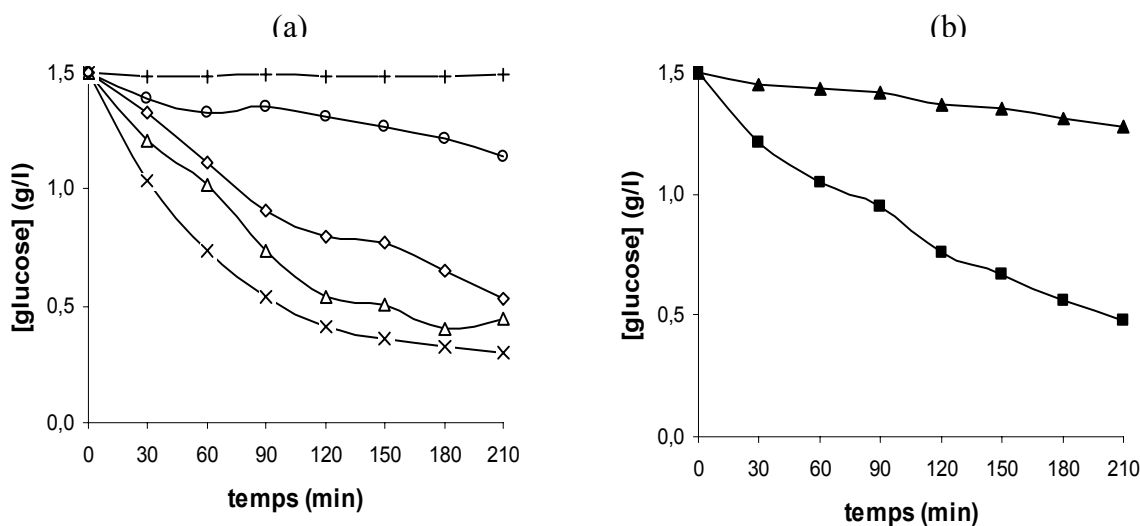


Figure 15 : Consommation du glucose en présence du LP-s optimisé à 25 °C, en réacteur, en milieu TSB-YE et en absence de souche

a : pourcentages en oxygène dissous maintenus constants à des valeurs de : 0 (+), 5 (○), 10 (◇), 15 (Δ) et 20 (×)

b : conditions initiales avec 16 % d'O<sub>2</sub> avec (■) ou sans agitation (▲)

Les essais son réalisés en double.

Les consommations en glucose sont de 1,0 mg.l<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> sans agitation et de 4,9 mg.l<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> avec agitation, donnant en 120 min des consommations respectives de 0,13 et de 0,74 g.l<sup>-1</sup>.

Après 90 min d'incubation en agitation, il n'y a plus d'oxygène résiduel détecté mais la concentration de glucose continue à diminuer.

La peroxydation du thiocyanate varie de manière importante selon les conditions testées (Figure 16 a et b). Lorsque le taux d'oxygène dissous est maintenu à une valeur prédéfinie (0, 5, 10, 15 et 20 %), la peroxydation du thiocyanate ne se produit qu'à partir d'une valeur seuil en oxygène dissous. En effet, en absence d'oxygène dissous, le LP-s ne fonctionne pas. La présence de 5 % d'oxygène permet la peroxydation de 4,4 mg.l<sup>-1</sup> de thiocyanate au cours de 120 min d'incubation. La peroxydation du thiocyanate est maximale avec 10 % d'oxygène dissous, de 0,171 mg.l<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, donnant 20,5 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup> peroxydé en 120 min. Entre 15 et 20 %, la vitesse de peroxydation du thiocyanate, respectivement 0,136 et 0,119 mg.l<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, est moins importante qu'en présence de 10 % d'oxygène dissous. Seulement 15 et 10,9 mg.l<sup>-1</sup> sont peroxydés en 120 min d'incubation ; ces résultats mettent en évidence une intoxication du système par des concentrations trop élevées en oxygène.

La peroxydation du thiocyanate est plus importante en agitation, 0,152 mg.l<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, qu'en statique, 0,038 mg.l<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, avec en 120 min respectivement 32 et 8 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup> peroxydé. La peroxydation du thiocyanate continue alors que la teneur en oxygène dissous est devenue indétectable par la sonde ; cette concentration d'oxygène dissous non détectée est néanmoins suffisante pour continuer l'oxydation du SCN<sup>-</sup>.

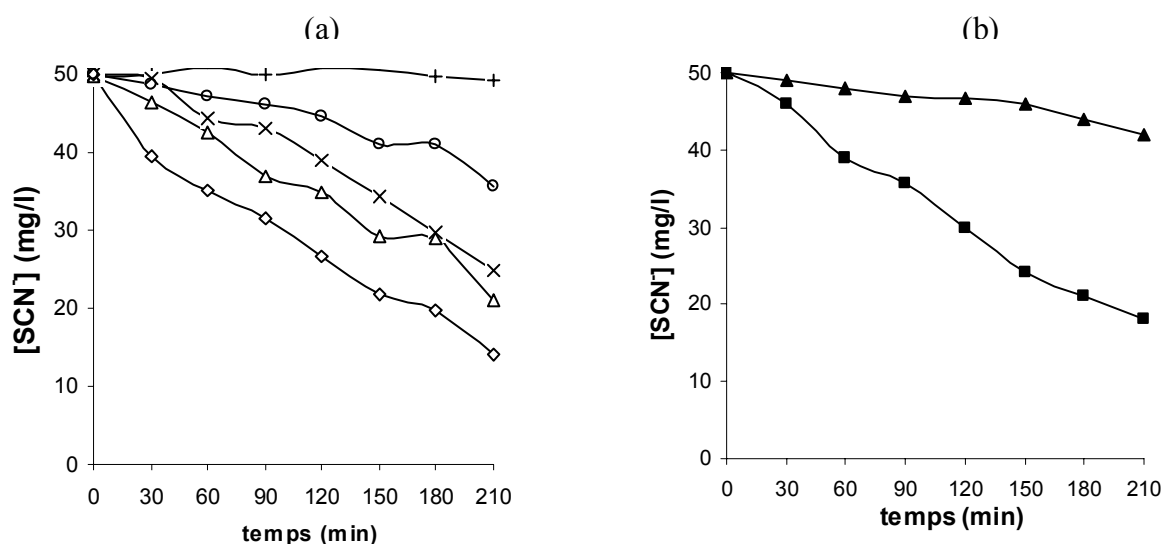


Figure 16 : Peroxydation du SCN<sup>-</sup> en réacteur, en milieu TSB-YE, en présence du LP-s optimisé à 25 °C et en absence de souche

a : pourcentages en oxygène dissous maintenus constants à des valeurs de : 0 (+), 5 (o), 10 (d), 15 (Δ) et 20 (x)

b : conditions initiales avec 16 % d'O<sub>2</sub> avec (■) ou sans agitation (▲)

Les essais sont réalisés en double.

Un apport trop important d'oxygène, 15 et 20 %, inhibe son fonctionnement. Kohler et Jenzer (1989) et Jantschko *et al.* (2005) avaient démontré qu'un excès d'oxygène inhibe la LPO.

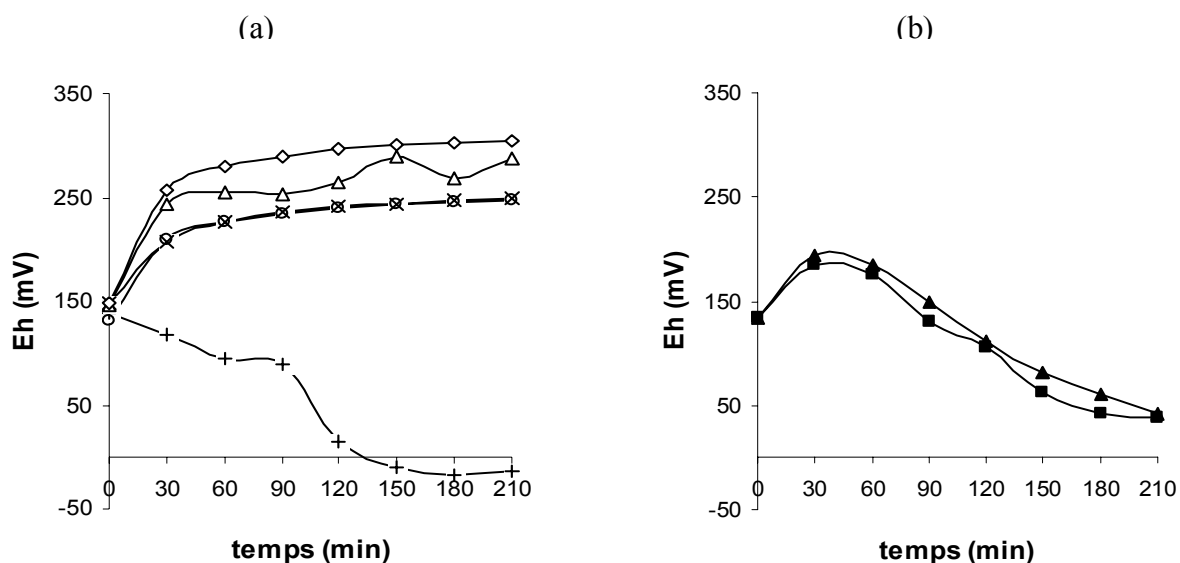


Figure 17 : Evolution du potentiel d'oxydo-réduction en réacteur, en milieu TSB-YE, en présence du LP-s optimisé à 25 °C et en absence de souche

a : pourcentages en oxygène dissous maintenus constants à des valeurs de : 0 (+), 5 (o), 10 (◇), 15 (Δ) et 20 (×)  
b : conditions initiales avec 16 % d'O<sub>2</sub> avec (■) ou sans agitation (▲)

Les essais sont réalisés en double.

L'évolution du potentiel d'oxydo-réduction (Eh) présente trois profils selon les conditions expérimentales testées (Figure 17a et b). Lorsque la teneur en oxygène dissous est maintenue à 0 %, le Eh varie de +139 à -13 mV. En absence d'oxygène dissous dans le milieu, le LP-s ne fonctionne pas, il n'y a ni consommation de glucose ni peroxydation du thiocyanate. Dans cette condition, la diminution du Eh serait donc uniquement liée au barbotage d'azote.

A l'inverse, pour toutes les autres teneurs constantes en oxygène dissous (5, 10, 15 et 20 %), la valeur de Eh croît pour atteindre en moyenne une valeur de + 250 mV. L'apport constant d'oxygène permet le maintien à environ + 250 mV du Eh. Les variations observées dans les conditions initiales (teneur initiale de 16 % en oxygène dissous, mais non maintenue) sont dues à la diminution progressive de l'oxygène dissous du milieu et aux variations de concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en acide gluconique et en OSCN<sup>-</sup> au cours de l'incubation.

Lorsque la teneur en oxygène n'est pas constante, la valeur du Eh augmente de +150 à +190 mV en 30 min et diminue ensuite progressivement à 40 mV en moyenne en 180 min. Un barbotage d'air ou d'un mélange air/azote maintient donc les valeurs du Eh à des valeurs

positives quelles que soient les concentrations d'azote introduites dans le réacteur et d' $\text{H}_2\text{O}_2$  générée par le système.

### ***Résumé***

**L'oxygène est nécessaire à l'oxydation du glucose par la GOD et à la synthèse de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , élément central du LP-s. Lorsque la teneur en oxygène est nulle, le système ne fonctionne pas. La concentration de 10 % permet la peroxydation d'une concentration maximale de  $\text{SCN}^-$ . Un apport d'oxygène trop important entraîne une diminution de la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  et est en relation directe avec une production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  accrue. Ces résultats montrent qu'un apport trop important de ce dernier substrat est une entrave au bon fonctionnement du système ; la nécessité d'une production progressive émise par Wolfson et Sumner (1993) est donc justifiée. Excepté lorsque la teneur en oxygène dissous est nulle, une agitation de la suspension permet une peroxydation plus rapide en favorisant la proximité des différents constituants du système lactoperoxydasique.**

#### II.6. Evolution des différents constituants du LP-s en milieu TSB-YE

Les concentrations des différents composants du LP-s ont été optimisées en solution tampon. L'étude porte sur l'analyse, à 4 °C, du fonctionnement du LP-s en milieu TSB-YE reconstitué en absence de souche avec deux teneurs initiales en glucose, 1,5 (concentration optimisée) ou 4  $\text{g.l}^{-1}$  (1,5 + 2,5  $\text{g.l}^{-1}$  qui est la concentration initialement présente dans le milieu TSB-YE commercial). Ces expériences ont été réalisées en triple. Les évolutions des valeurs de pH, des teneurs en glucose et en  $\text{SCN}^-$  sont analysées.

Les valeurs de pH diminuent de manière constante, 0,001  $\text{u.h}^{-1}$  pendant 296 h d'incubation à 4 °C, soit une variation finale de 0,3 unités de pH au cours de l'incubation (Figure 18). Cette acidification est uniquement due à la production d'acide gluconique. La teneur initiale en glucose (1,5 ou 4  $\text{g.l}^{-1}$ ) n'affecte pas cette diminution car les valeurs de pH relevées dans les deux cas sont statistiquement proches ou identiques.



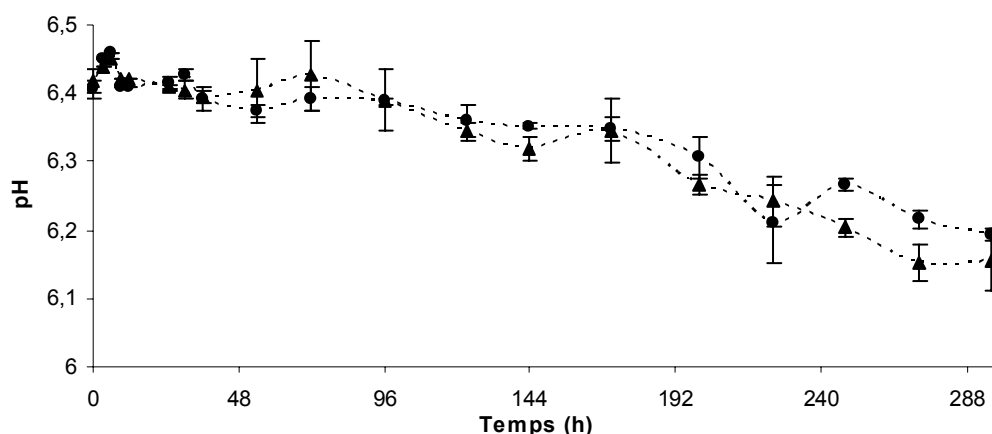


Figure 18 : Evolution de la valeur du pH en fonction de la concentration initiale en glucose, 1,5 (●) ou 4 g.l<sup>-1</sup> (▲), à 4 °C en milieu TSB-YE reconstitué en présence du LP-s optimisé

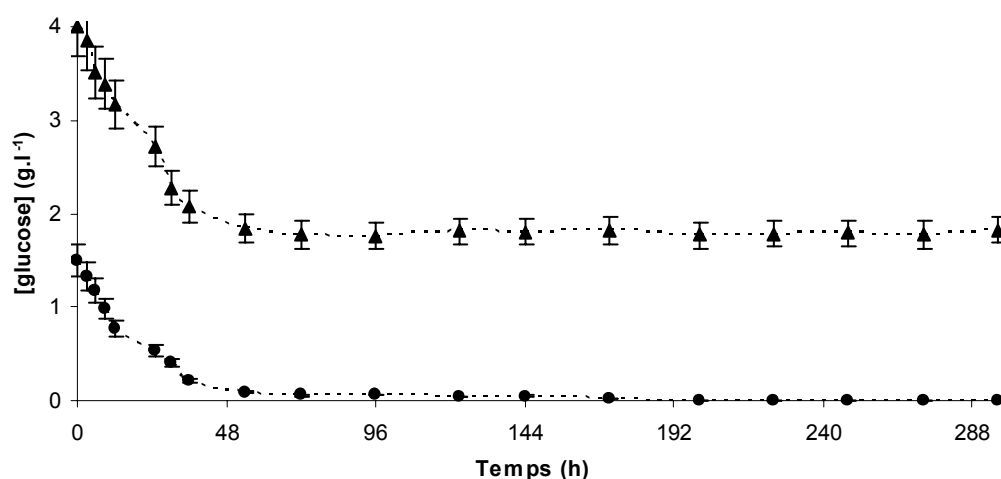


Figure 19 : Evolution de la teneur en glucose en fonction de la concentration initiale en glucose, 1,5 (●) ou 4 g.l<sup>-1</sup> (▲), à 4 °C en milieu TSB-YE reconstitué en présence du LP-s optimisé

Pendant les 36 premières heures d'incubation, la consommation en glucose est de 1,9 et de 1,3 g.l<sup>-1</sup> (35 et 55 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) en présence de respectivement 1,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose initial (Figure 19). Après 48 h d'incubation, la consommation en glucose devient nulle ; elle est totale pour le milieu contenant 1,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose initial et partielle (2,07 g.l<sup>-1</sup>) pour celui en contenant 4 g.l<sup>-1</sup>. Les vitesses de consommation du glucose avec les deux concentrations initiales sont proches, les productions d'acide gluconique sont donc similaires, ce qui justifie le fait que les variations de pH dans les deux conditions soient statistiquement identiques.

La concentration initiale en SCN<sup>-</sup> est de 50 mg.l<sup>-1</sup> (0,5 mM). Sa vitesse de peroxydation n'est pas affectée par la teneur initiale en glucose, car les résultats sont significativement identiques

(Figure 20). Au cours des 36 premières heures d'incubation, 40 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup> sont peroxydés (1,12 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Tout le SCN<sup>-</sup> est peroxydé en 72 h d'incubation. L'absence de différence dans les vitesses de peroxydation pour les deux teneurs initiales en glucose indique que ce substrat est en excès.

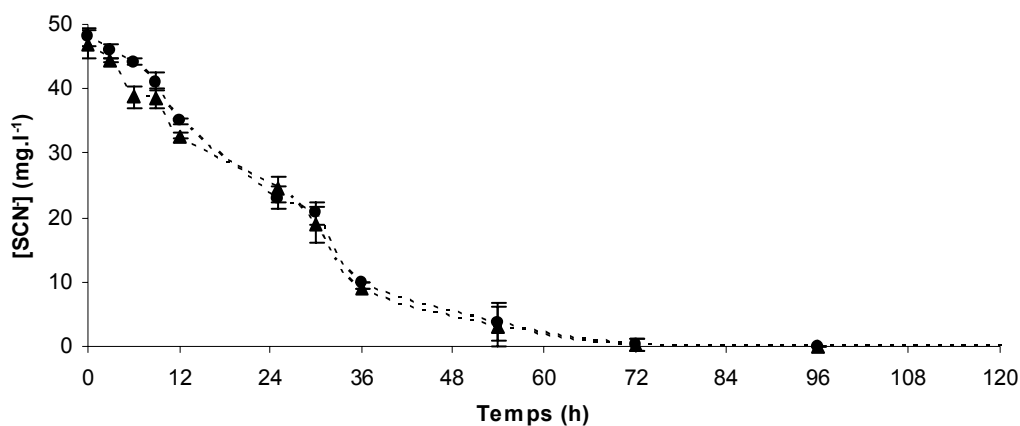


Figure 20 : Evolution de la teneur en SCN<sup>-</sup> en présence du LP-s optimisé à 4 °C en milieu TSB-YE reconstitué, en fonction de la teneur initiale en glucose , 1,5 (●) ou 4 g.l<sup>-1</sup> (▲)

Après 24 h d'incubation, 6,6 mM de glucose sont consommées donc 6,6 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont produites. Dans ce même laps de temps, le système peroxyde 0,3 mM de SCN<sup>-</sup>. Il y a donc une fuite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hors du système, en partie due à l'activité catalasique de la GOD. Après 48 h et arrêt de la consommation du glucose, le système continue à peroxyder le SCN<sup>-</sup> jusqu'à disparition de ce dernier. Ces résultats corroborent les observations de Nicol et Duke (1966), Carlsson (1983), Dionysius *et al.* (1992), Kussendrager et van Hooijdonk (2000). La concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite et accumulée en 36 h serait suffisante au fonctionnement de la LPO mais serait la raison d'une intoxication de la GOD, comme l'avaient démontré Nicol et Duke (1966) et Miron *et al.* (2004).

Aucune réduction des composés oxydés en SCN<sup>-</sup> n'est observée jusqu'à 296 h, comme l'avaient suggéré Reiter et Härnulf (1984), de Witt et van Hooydonk (1996) et O'Brien (2000).

### ***Résumé***

**La faible acidification du pH du milieu est due la production d'acide gluconique. La concentration en glucose a été correctement optimisée car un apport plus important de ce substrat au LP-s n'a aucune incidence sur la consommation du glucose et sur la peroxydation du SCN<sup>-</sup>. En effet, pour les deux teneurs étudiées, 1,5 et 4 g.l<sup>-1</sup>, la**

consommation du glucose s'arrête après 48 h d'incubation, soit par épuisement de ce substrat, soit par un défaut d'O<sub>2</sub>, soit par intoxication de l'enzyme et les vitesses de peroxydation du SCN<sup>-</sup> sont statistiquement identiques. Le SCN<sup>-</sup> est totalement consommé après 72 h d'incubation, ce qui signifie que la concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> résiduelle dans le milieu, après l'arrêt de sa production, est suffisante pour sa peroxydation.

### III. Impact du LP-s sur la croissance bactérienne

L'optimisation des concentrations des composants du LP-s et l'étude de son fonctionnement ayant été réalisés, la suite de cette étude porte sur l'impact du LP-s optimisé sur la croissance bactérienne des quatre souches tests.

Une première série d'analyses a été réalisée en milieu TSB-YE afin de tester les concentrations minimales inhibitrices et l'effet antibactérien du LP-s en cultures pures et mixtes.

La dernière partie de ce travail porte sur la création d'un milieu modèle poisson. Le dosage du SCN<sup>-</sup> dans ce milieu a dû être adapté à la complexité de la matrice et la croissance des quatre souches tests a été vérifiée. De la même manière qu'en milieu TSB-YE, des analyses en cultures pures et mixtes ont été conduites afin d'évaluer l'impact du LP-s sur la croissance des souches. Une analyse des acides gras dans ces différentes conditions a permis d'estimer l'impact du LP-s sur les lipides qui peuvent être peroxydés par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### III.1. Etude en milieu TSB-YE

##### III.1.1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) permet de déterminer le niveau de sensibilité des souches au LP-s optimisé. Elles ont été réalisées à 4 °C et à la température optimale de croissance de chacune des souches.

Les expérimentations ont été réalisées avec *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. Les concentrations optimisées du LP-s retenues à partir du plan d'expériences sont 1,5 g.l<sup>-1</sup> pour le glucose, 25 mg.l<sup>-1</sup> pour la LPO, 1,5 mg.l<sup>-1</sup> pour la GOD en présence de 50 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup>. Les essais sont conduits pendant 296 h, à 4 °C et à la température optimale de croissance de chacune des quatre souches ; ils ont tous été réalisés en triple. Dans le premier

cas, les quatre constituants du LP-s sont introduits en début de culture, à to (CMI-LP-s). Les constituants du système sont utilisés à différentes concentrations, celles optimisées, et à des dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32.

Dans un deuxième cas, le  $\text{SCN}^-$  est peroxydé pendant 72 h (CMI-OSCN $^-$ ). Après vérification de la peroxydation totale du  $\text{SCN}^-$ , la solution d'OSCN $^-$  est ajoutée en début de culture pure, à des dilutions de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. La variation du pH, la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  (dans le cas des CMI-LP-s), l'oxydation du glucose et la population bactérienne seront suivis pendant 296 h d'incubation. Dans le cas des essais CMI-OSCN $^-$ , le thiocyanate et le glucose sont totalement consommés avant la mise en route de l'expérimentation.

Pour la détermination des CMI en milieu liquide, l'évolution de la valeur du pH et de la numération par le suivi de l'absorbance n'ont pas donné de résultats exploitables.

Les tests réalisés, CMI-LP-s et CMI-OSCN $^-$ , par dépôts de gouttes sur la surface et en puits creusés dans le milieu solide TSA-YE n'ont permis aucune observation d'une éventuelle zone d'inhibition. En effet, des expérimentations préalables ont montré que pour permettre une visualisation sur milieu gélosé d'une inhibition de la croissance bactérienne, les concentrations de chaque constituant du LP-s doivent être au moins multipliées par 50 (Cailliez-Grimal *et al.*, 2002).

En présence des quatre souches seules, la peroxydation du  $\text{SCN}^-$  et l'oxydation du glucose sont quasiment identiques (Tableau 18). Les vitesses initiales de peroxydation du  $\text{SCN}^-$  et de consommation du glucose ne sont que peu affectées par la diminution des concentrations des composants du LP-s et ce jusqu'à la dilution au 1/8<sup>ème</sup>. Après la dilution au 1/16<sup>ème</sup>, les vitesses initiales sont d'autant plus faibles que le LP-s est dilué. Les mêmes résultats sont observés à 4 °C et aux températures optimales de croissance des quatre souches.

Bien avant la fin de l'incubation (296 h), la totalité du glucose est consommée quelles que soient les conditions expérimentales, et ce d'autant plus rapidement que sa concentration initiale est importante.

| Températures<br>(°C) | Paramètres   | Concentrations du LP-s |                 |                |                 |                 |                 |
|----------------------|--|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                      |  | LP-s                   | LP-s / 2        | LP-s / 4       | LP-s / 8        | LP-s / 16       | LP-s / 32       |
| 4                    | $V_{i\text{peroxydation SCN}^-}$<br>( $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )   | $1,0 \pm 0,12$         | $0,87 \pm 0,08$ | $0,91 \pm 0,1$ | $0,96 \pm 0,09$ | $0,51 \pm 0,04$ | $0,35 \pm 0,12$ |
|                      | $V_{i\text{consommation glucose}}$<br>( $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) | $83,3 \pm 3$           | $81,2 \pm 2,7$  | $84 \pm 3,1$   | $80,8 \pm 2,1$  | $53 \pm 2,9$    | $38,4 \pm 1,5$  |
| $T_{\text{op}}$      | $V_{i\text{peroxydation SCN}^-}$<br>( $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )   | $2,4 \pm 0,14$         | $2,1 \pm 0,12$  | $2,2 \pm 0,09$ | $1,93 \pm 0,1$  | $0,97 \pm 0,08$ | $0,42 \pm 0,11$ |
|                      | $V_{i\text{consommation glucose}}$<br>( $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) | $164,5 \pm 3,6$        | $166,1 \pm 3,1$ | $161 \pm 1,9$  | $162 \pm 2,6$   | $91,2 \pm 2,6$  | $53 \pm 2,7$    |

Tableau 18 : Vitesses initiales de consommation du  $\text{SCN}^-$  et du glucose ( $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) et concentration totale de glucose consommé ( $\text{g.l}^{-1}$ ) après 296 h d'incubation, à 4 °C et à la température optimale de chaque souche, en milieu TSB-YE en présence des différentes souches en cultures pures, pour différentes concentrations en LP-s

$T_{\text{op}}$  : température optimale de chaque souche ; 37 °C pour *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, 25 °C pour *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, 30 °C pour *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et 25 °C pour *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. Les tests ont été réalisés en triple.

La souche *Listeria monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est plus sensible au LP-s après 296 h d'incubation à 4 qu'à 37 °C (Figure 21a). En effet, à 4 °C, un ralentissement de la croissance est conservé jusqu'à la dilution au 1/16 (niveau de population finale de  $1,1.10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup>), contrairement à 37 °C où dès la dilution au 1/4, la population finale est identique à celle obtenue en absence d'agent antibactérien ( $4,2.10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>).

Lorsque les expériences sont conduites avec de l'OSCN<sup>-</sup>, les populations n'atteignent jamais les mêmes niveaux que ceux des témoins (Figure 21b). La bactériostase est observée à 4 °C jusqu'à une dilution au 1/4 (niveau de population finale de  $4,2.10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>) ; pour les dilutions plus importantes, la croissance de la souche est ralentie. A 37 °C, la bactériostase est maintenue jusqu'à une dilution au 1/8.

L'OSCN<sup>-</sup> aura un effet inhibiteur plus important sur la croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> que le LP-s. Donc un apport initial important d'agent antibactérien est plus efficace sur l'inhibition de sa croissance qu'une production progressive.

Quelles que soient les conditions expérimentales, l'effet de l'agent antibactérien est plus important à 4 qu'à 37 °C, ce qui conforte à la théorie des barrières.

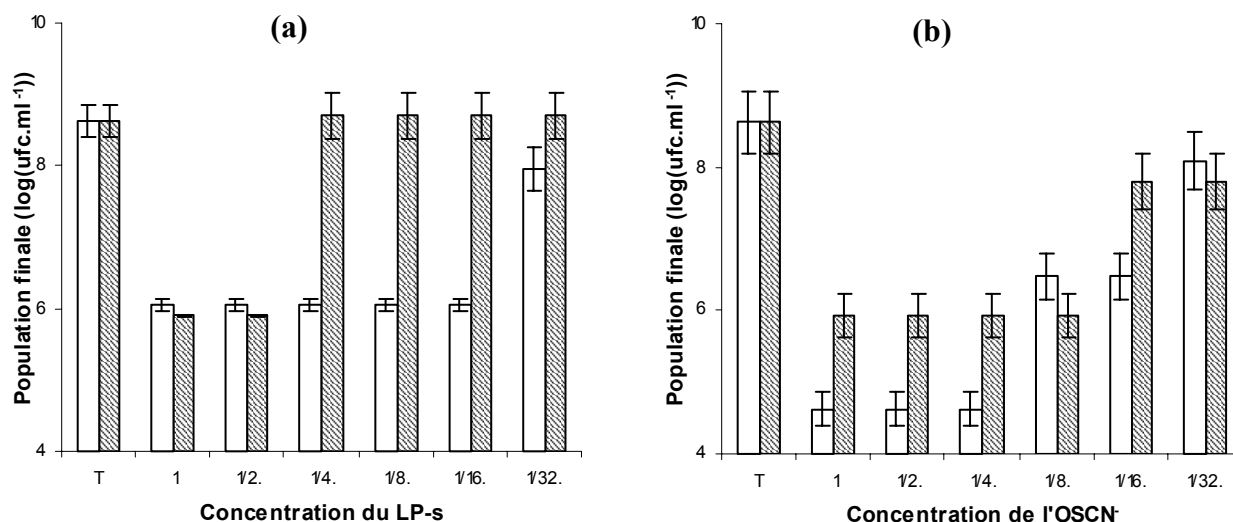


Figure 21 : Population en *Listeria monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> après 296 h d'incubation en milieu TSB-YE à 4 et 37 °C en présence de différentes concentrations en LP-s ou en OSCN<sup>-</sup>. Le comportement de la souche est suivi avec différentes concentrations de LP-s (a) ou avec différentes concentrations en OSCN<sup>-</sup> (b) à 4 (□) et à 37 °C (▨). La population initiale est de  $6,4 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>. T : témoin. Les tests ont été réalisés en triple.

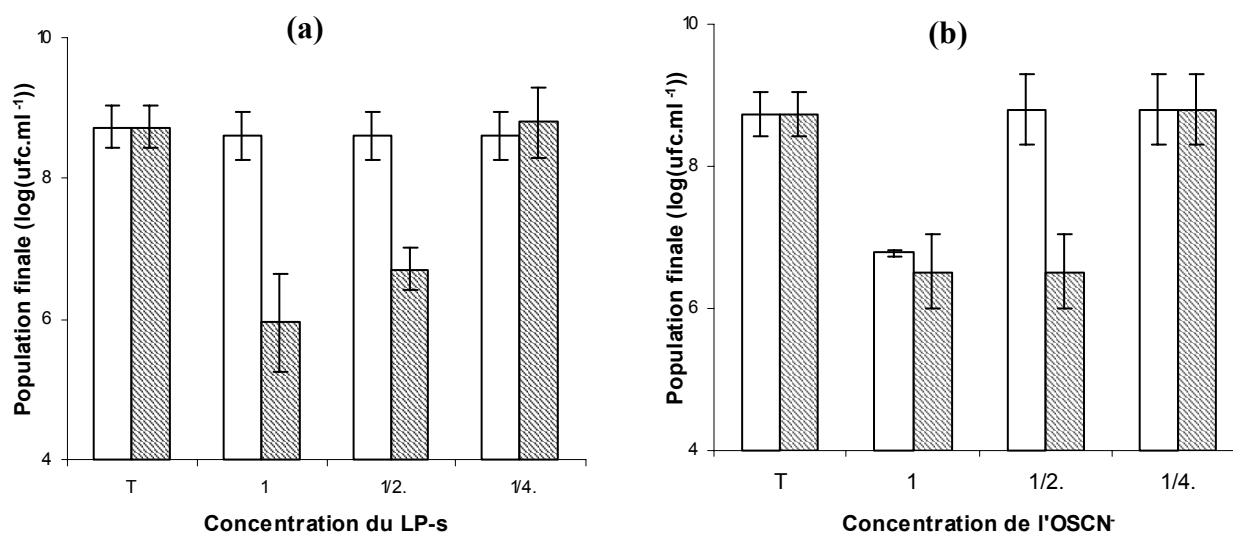


Figure 22 : Population en *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> après 296 h d'incubation en milieu TSB-YE à 4 et 25 °C en présence de différentes concentrations en LP-s ou en OSCN<sup>-</sup>. Le comportement de la souche est suivi avec différentes concentrations de LP-s (a) ou avec différentes concentrations en OSCN<sup>-</sup> (b) à 4 (□) et à 25 °C (▨). La population initiale est de  $3,5 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>. T : témoin. Les tests ont été réalisés en triple.

La souche *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> est aussi sensible, à 25 °C, à l'action de l'OSCN<sup>-</sup> qu'à l'action du LP-s (Figure 22). Dès que la dilution de LP-s ou d'OSCN<sup>-</sup> est supérieure à 1/2, l'agent antibactérien n'a plus d'impact significatif sur la croissance (niveau de

population finale de  $6,3 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>). Dans le cas de l'OSCN<sup>-</sup> à 4 °C, sa croissance est ralentie uniquement lorsque le LP-s est utilisé dans les conditions optimisées, sans dilution (niveau de population finale de  $6,0 \cdot 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup>). A 25 °C, le LP-s optimisé et celui dilué au 1/2 ralentissent la croissance de la souche au cours des 296 h d'incubation (niveau de population finale entre  $9,1 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup> et  $5,1 \cdot 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup>). Cette souche est moins sensible que *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> dans toutes les conditions expérimentales testées, et de ce fait la différence d'activité entre le LP-s et l'OSCN<sup>-</sup> est beaucoup moins prononcée.

*C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> n'est pas sensible à l'effet du LP-s à 25 °C ; mais un retard de la croissance est visible à 4 °C pour un système antibactérien dilué jusqu'au 1/4 (niveau de population finale de  $8,7 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup>) (Figure 23).

L'OSCN<sup>-</sup> a un effet inhibiteur plus important que le LP-s. En effet, à 30 °C, le niveau de population final des essais (niveau de population final entre  $7,0 \cdot 10^6$  et  $3,5 \cdot 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup>) n'atteint jamais celui du témoin (niveau de population finale de  $3,2 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>). A 4 °C, le retard de croissance observé jusqu'à la dilution au 1/4 présente un écart de 3,1 unités log<sub>10</sub> comparativement au témoin. Aux deux températures, les populations finales atteintes sont proches de celle du témoin mais pas identiques.

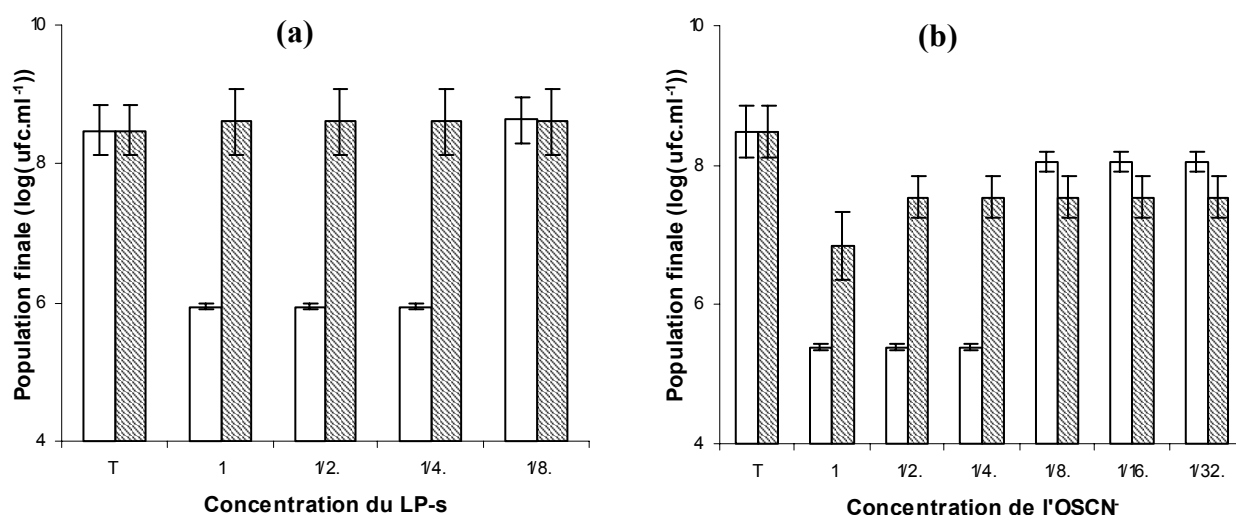


Figure 23 : Population en *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> après 296 h d'incubation en milieu TSB-YE à 4 et 30 °C en présence de différentes concentrations en LP-s ou en OSCN<sup>-</sup>

Le comportement de la souche est suivi avec différentes concentrations de LP-s (a) ou avec différentes concentrations en OSCN<sup>-</sup> (b) à 4 °C (□) et à 30 °C (▨). La population initiale est de  $5,5 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>. T : témoin. Les tests ont été réalisés en triple.

De même que dans le cas de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> est plus inhibée à 4 °C qu'à la température optimale de croissance ; à 4 °C les membranes des bactéries sont plus fragiles ce qui expliquerait l'effet antibactérien accru à cette basse température car l'OSCN<sup>-</sup> s'attaque d'abord aux membranes (Thomas et Aune, 1978a ; Marshall et Reiter, 1980 ; Law et John, 1981).

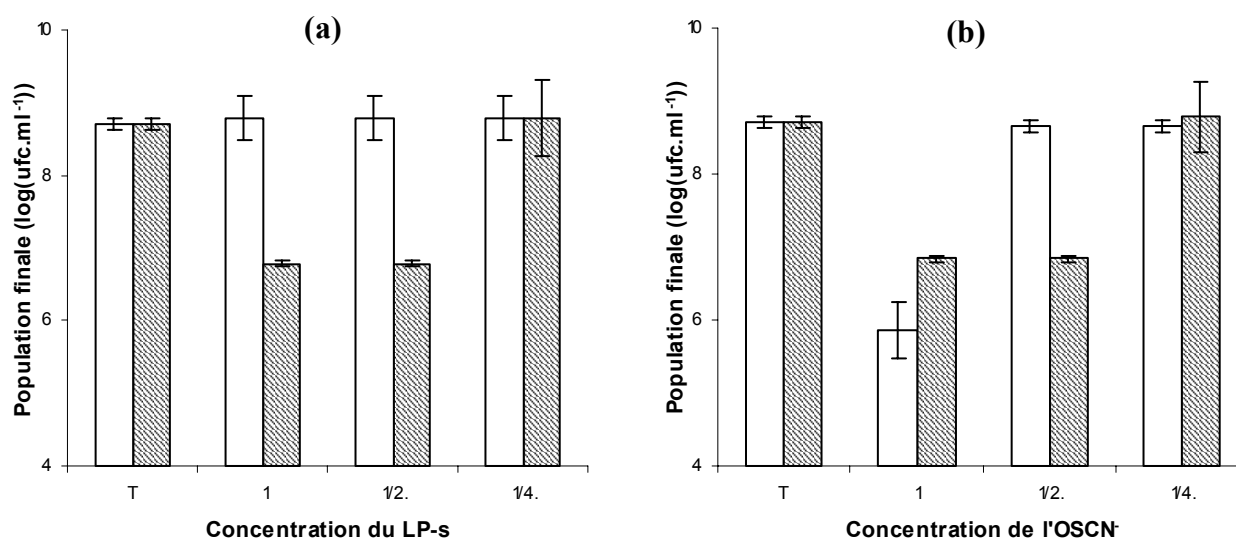


Figure 24 : Population en *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> après 296 h d'incubation en milieu TSB-YE à 4 et 25 °C en présence de différentes concentrations en LP-s ou en OSCN<sup>-</sup>. Le comportement de la souche est suivi avec différentes concentrations de LP-s (a) ou avec différentes concentrations en OSCN<sup>-</sup> (b) à 4 °C (□) et à 25 °C (▨). La population initiale est de  $6,6 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Les tests ont été réalisés en triple.

*S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est plus sensible au LP-s à 25 qu'à 4 °C (Figure 24). A 4 °C la population finale des essais est identique à celle obtenue avec le témoin,  $5,1 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>. A sa température optimale de croissance, 25 °C, *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est sensible au LP-s optimisé et à celui dilué au 1/2, l'écart de population entre le témoin et ces deux essais est d'environ 2 unités log<sub>10</sub>.

Cette souche est plus sensible à l'OSCN<sup>-</sup> qu'au LP-s. A 4 °C et après 296 h d'incubation, un écart de 2,9 unités log<sub>10</sub> est observé lorsque l'OSCN<sup>-</sup> n'a pas été dilué. A 25 °C, cet écart est moins important, de 2 unités log<sub>10</sub>, mais il est également présent lorsque l'OSCN<sup>-</sup> est dilué au 1/2.

De même que dans le cas de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> est plus inhibée à 4 °C qu'à la température optimale de croissance ; à 4 °C les membranes des bactéries sont plus fragiles ce qui expliquerait l'effet



antibactérien accru à cette basse température car l'OSCN<sup>-</sup> s'attaque d'abord aux membranes (Thomas et Aune, 1978a ; Marshall et Reiter, 1980 ; Law et John, 1981).

Il a été montré que la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives est un obstacle plus grand à l'action de l'OSCN<sup>-</sup> que ne l'est la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives (Reiter *et al.*, 1964 ; Clem et Klebanoff, 1966 ; Reiter *et al.*, 1976). Dans notre cas, c'est une souche Gram-positive qui est la plus sensible, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>.

### Résumé

*L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est la souche la plus sensible au LP-s ou à l'OSCN<sup>-</sup>, sa sensibilité étant supérieure à 4 °C qu'à 25 °C. Les autres souches ont une sensibilité supérieure à l'OSCN<sup>-</sup> par rapport à celle observée avec le LP-s ; ces observations sont similaires à 4 °C et à la température optimale des quatre souches. Les concentrations utilisées ne peuvent pas être diminuées car *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, à 4 °C, n'est sensible que lorsque le LP-s n'est pas dilué.

| Inhibiteurs       | Températures | Souches bactériennes                              |   |  |  |
|-------------------|--------------|---|---|--|--|
|                   |              | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i><br>DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i><br>CIP 80.40 <sup>T</sup> |
| LP-s              | 4 °C         | 1/16  | 0   | 1/4  | 0  |
|                   | optimale     | 1/2   | 1/2   | 0  | 1/2  |
| OSCN <sup>-</sup> | 4 °C         | 1/16  | 1   | 1/8  | 1/2  |
|                   | optimale     | 1/8   | 1/2   | 1  | 1/2  |

#### III.1.2. Impact du LP-s sur la croissance des souches à 4 °C

Les expérimentations sont réalisées en milieu TSB-YE reconstitué, à 4 °C sans agitation, en présence ou en absence du LP-s optimisé, en présence ou en absence de chacune des quatre souches tests de l'étude, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. Tous les essais ont été réalisés en triple.

Le LP-s optimisé est composé de 85,5 UI.l<sup>-1</sup> de GOD, 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de glucose, de 50 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup> et 3930 UI.l<sup>-1</sup> de LPO à une valeur initiale de pH de 6,5. Le milieu TSB-YE commercialisé contient 2,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Différentes concentrations initiales en glucose ont été testées afin d'étudier la part du glucose oxydée par le LP-s et celle fermentée par la ou les

souches ; ces concentrations sont 0, 1,5, 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> (1,5 g.l<sup>-1</sup> correspond à la concentration en glucose du système optimisé et 2,5 g.l<sup>-1</sup> à la concentration en glucose présente dans le TSB-YE commercial). Ces concentrations permettront de vérifier que la concentration en glucose n'est pas limitante lorsque le LP-s est ajouté à une ou à plusieurs souches.

### *Listeria monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>

❖ En absence de LP-s, la croissance de *L. monocytogenes* n'est pas affectée de manière significative par les teneurs initiales en glucose comprises entre 0 et 4 g.l<sup>-1</sup> (Figure 25). La population augmente de 6,6.10<sup>4</sup> à 4,8.10<sup>8</sup> ufc.ml<sup>-1</sup> entre 36 et 130 h d'incubation ( $\mu_{\max}$  de 0,095 h<sup>-1</sup> entre 48 et 60 h), pour atteindre 1.10<sup>9</sup> ufc.ml<sup>-1</sup> après 172 h d'incubation.

Le système LP provoque un retard de croissance quasi identique (moins de 0,5 unité log d'écart) en présence de 1,5 ou de 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Après une phase de latence de 124 h, la souche est en phase de croissance modérée jusqu'à la fin de l'incubation ; la population augmente ainsi de 7.10<sup>4</sup> (124 h) à 3.10<sup>6</sup> ufc.ml<sup>-1</sup> (296 h). Après 172 h d'incubation, l'écart maximum entre les populations en absence ou en présence de LP-s, est de 4 unités log<sub>10</sub> ; après 296 h d'incubation, il n'est plus que de 2,4 unités log<sub>10</sub>.

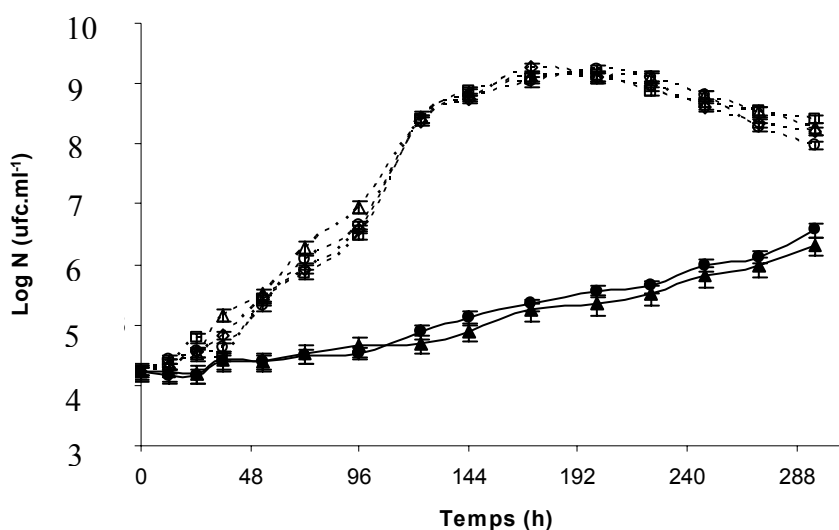


Figure 25 : Croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> à 4 °C en milieu TSB-YE, en absence (....., symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○, ●), 2,5 (◇) et 4 (Δ, ▲) g.l<sup>-1</sup>

❖ En absence de LP-s, l'acidification est en relation avec à la concentration initiale en glucose (Figure 26). Plus elle est importante, plus l'activité métabolique de la souche est élevée ce qui se traduit par une acidification plus rapide et forte, par une production d'acide lactique. En absence de glucose, la diminution du pH est constante dans le temps à

raison de 0,55 unité en 296 h d'incubation ( $0,002 \text{ u.h}^{-1}$ ). En présence de glucose, un retard d'environ 48 h est observé au niveau de l'acidification du milieu. Pour une teneur initiale en glucose de  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ , entre 96 et 296 d'incubation, la valeur du pH diminue de 0,7 unité. En moins de 160 h d'incubation, pour respectivement  $2,5$  ou  $4 \text{ g.l}^{-1}$  en glucose, la variation de pH est de 1 ou de 1,4 unité de pH.

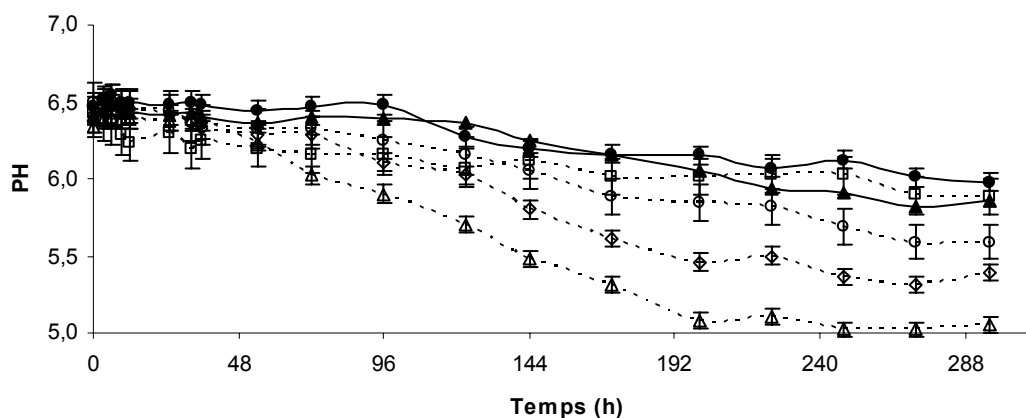


Figure 26 : Evolution de la valeur du pH à  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en présence de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> en milieu TSB-YE, en absence (....., symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de  $0$  ( $\square$ ),  $1,5$  ( $\circ$ ),  $2,5$  ( $\diamond$ ) et  $4$  ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ )  $\text{g.l}^{-1}$

En présence de LP-s, l'acidification, n'est observée qu'après 120 h d'incubation, après l'effet bactériostatique. Cette durée correspond à la lente reprise de croissance de la souche. Après 120 h d'incubation, les valeurs de pH diminuent de  $0,0025$  et de  $0,005 \text{ u.h}^{-1}$  pour respectivement  $1,5$  et  $4 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose, par production d'acide lactique. La faible acidification observée lors des expériences en absence de souche, due à la production d'acide gluconique par le système, n'est pas statistiquement mesurée lorsque la souche est inhibée.

❖ En absence de LP-s, pour les différentes concentrations initiales en glucose, les représentations des fermentations en glucose par *L. monocytogenes* sont des asymptotes (Figure 27). A 296 h d'incubation, elle est totale pour le milieu contenant  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose ; elle est respectivement de  $1,8$  et  $2,15 \text{ g.l}^{-1}$  en présence de  $2,5$  et  $4 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose.

En présence du LP-s, la consommation en glucose (fermentation par la souche et oxydation par la GOD) est très rapide au cours des 48 premières heures d'incubation, puis elle ralentit fortement. La consommation de glucose est totale pour le milieu contenant  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  et partielle ( $3,4 \text{ g.l}^{-1}$ ) pour celui à  $4 \text{ g.l}^{-1}$ .

Lors de la croissance lente de la souche en présence du LP-s, la consommation du glucose est d'autant plus importante que sa teneur initiale est élevée. Ceci correspond à la concentration consommée par le LP-s ( $2,1 \text{ g.l}^{-1}$ ) et à celle qui est consommée par la souche ( $1,3 \text{ g.l}^{-1}$ ).

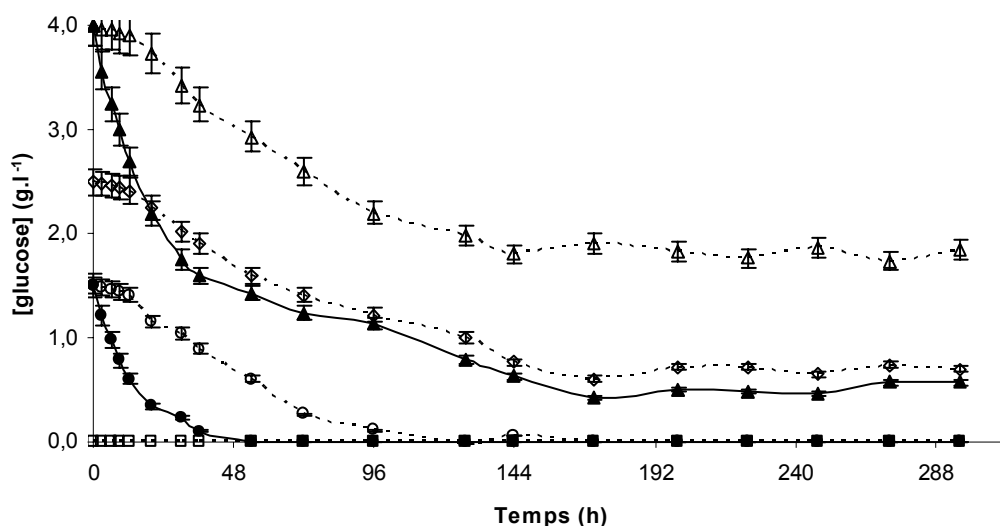


Figure 27 : Evolution de la teneur en glucose à 4 °C en présence de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> en milieu TSB-YE, en absence (---, symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○, ●), 2,5 (◇) et 4 (Δ, ▲) g.l<sup>-1</sup>

❖ La concentration initiale en  $\text{SCN}^-$  est de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  ( $0,5 \text{ mM}$ ). La vitesse de peroxydation est plus rapide en présence de la souche (Figure 28). Au cours des 36 premières heures d'incubation,  $42,8$  et  $44,9 \text{ g.l}^{-1}$  sont consommés pour respectivement  $1,5$  et  $4 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose (soit  $1,19$  et  $1,25 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Le  $\text{SCN}^-$  est totalement peroxydé en 72 h d'incubation. Aucune réduction des composés oxydés en  $\text{SCN}^-$  n'est observée jusqu'à 296 h. Aucune reprise de croissance rapide de la souche n'est observée, même en défaut de thiocyanate. Il reste donc suffisamment de produits oxydés dans le milieu pour limiter la croissance de *L. monocytogenes* au cours de 296 h d'incubation à 4 °C.

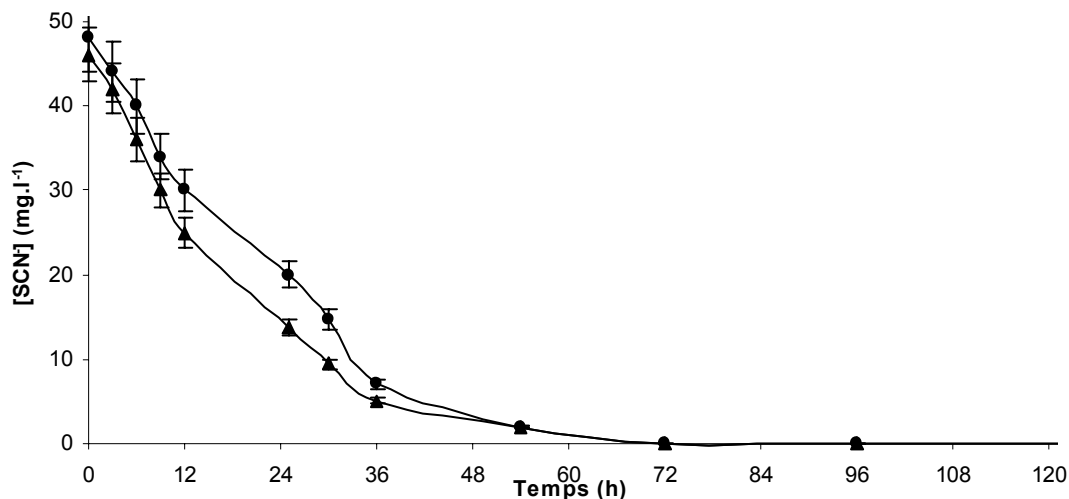


Figure 28 : Evolution de la teneur en SCN<sup>-</sup> en présence du LP-s et de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> à 4 °C avec des concentrations initiales en glucose (g.l<sup>-1</sup>) de 1,5 (●) et 4 (▲)

### *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>

❖ En absence de LP-s à 4 °C, la croissance de *B. thermosphacta* n'est pas affectée de manière significative par les teneurs initiales en glucose comprises entre 0 et 4 g.l<sup>-1</sup> (Figure 29). La population augmente de  $1,5 \cdot 10^5$  à  $2,6 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> en 96 h ( $\mu_{\max}$  de  $0,101$  h<sup>-1</sup> entre 48 et 60 h), pour atteindre  $8 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> après 172 h d'incubation.

Le système LP exerce un effet bactériostatique quasi identique (moins de 0,5 unité log d'écart) en présence de 1,5 ou de 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose jusqu'à 96 h d'incubation. La souche est en phase de croissance modérée jusqu'à 144 h d'incubation. Pendant la phase de croissance plus rapide, la population augmente de  $2 \cdot 10^5$  à  $1 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> à 260 h d'incubation, avec un  $\mu_{\max}$  de  $0,079$  h<sup>-1</sup> entre 172 et 200 h. L'écart maximum entre les conditions avec et sans agent antibactérien est de 3,7 unités log<sub>10</sub> à 150 h d'incubation. L'ajout de LP-s retarde la croissance de *B. thermosphacta* d'environ 144 h à 4 °C.

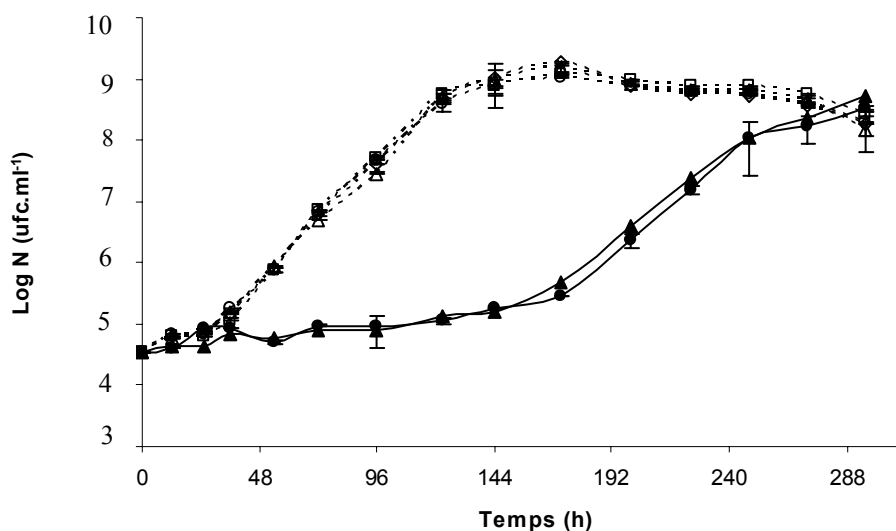


Figure 29 : Croissance de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> à 4 °C en milieu TSB-YE, en absence (....., symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○, ●), 2,5 (◇) et 4 (Δ, ▲) g.l<sup>-1</sup>

❖ En absence de LP-s, la diminution de la valeur du pH est en relation avec à la teneur initiale en glucose, est due à la production d'acide lactique par la souche ; plus la teneur initiale est élevée, plus l'acidification est importante (Figure 30). En absence de glucose ou avec une teneur initiale de 1,5 g.l<sup>-1</sup>, les acidifications, dues à la consommation des autres sources hydrocarbonées du milieu, sont constantes dans le temps, respectivement de 0,5 et de 0,6 unité pendant 296 h d'incubation (soit 0,0015 et 0,0019 u.h<sup>-1</sup>). Pour les teneurs initiales de 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> en glucose, entre 36 et 171 h d'incubation, les valeurs du pH diminuent de 0,7 et de 0,8 unité.

En présence de LP-s et de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, la plus forte variation des valeurs du pH est observée après 192 h d'incubation. Ce temps permet la croissance rapide de la souche. Après 192 h d'incubation, les valeurs de pH diminuent de 0,27 ou de 0,50 unité respectivement pour 1,5 ou 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose jusqu'à la fin de l'incubation à 4 °C.

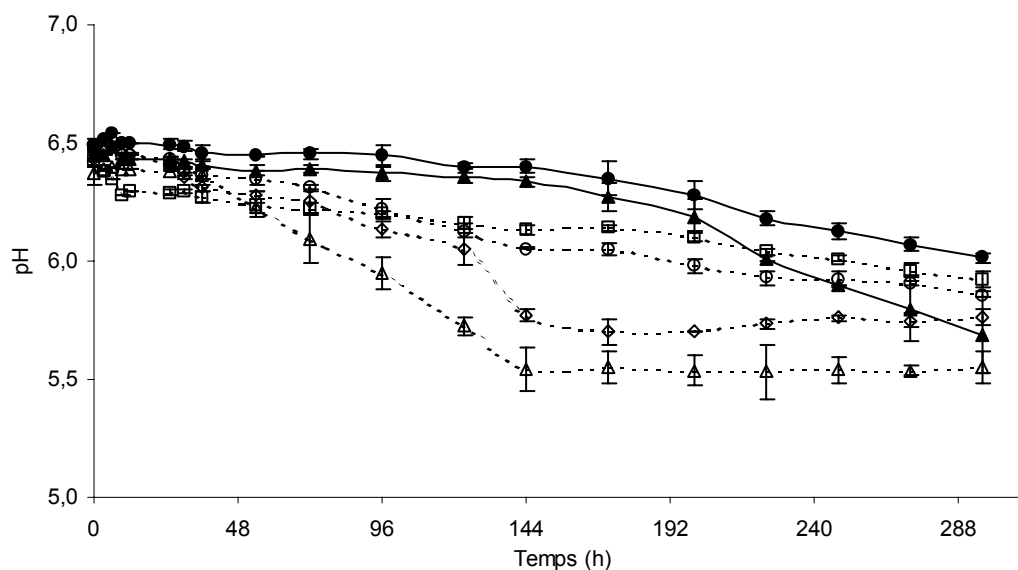


Figure 30 : Evolution de la valeur du pH à 4 °C en présence de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> en milieu TSB-YE, en absence (-----, symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○), 2,5 (◇) et 4 (Δ, ▲) g.l<sup>-1</sup>

❖ En absence de LP-s, la fermentation est la plus rapide pendant les 96 premières heures d'incubation avec 1,3, 1,25 et 2 g.l<sup>-1</sup> pour respectivement 1,5, 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> en glucose. (Figure 31). Pour 1,5 g.l<sup>-1</sup>, la concentration résiduelle en glucose est nulle après 123 h d'incubation. En présence de 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose, la concentration totale de glucose consommée après 168 h d'incubation est respectivement de 1,65 et 2,33 g.l<sup>-1</sup>.

En présence du LP-s, la consommation en glucose est plus importante au cours des 36 premières heures d'incubation. Avec 1,5 g.l<sup>-1</sup>, la consommation est de 1,4 g.l<sup>-1</sup> jusqu'à 36 h d'incubation, elle diminue ensuite jusqu'à 48 h d'incubation où la concentration résiduelle en glucose est nulle. Avec une teneur initiale de 4 g.l<sup>-1</sup>, au cours des 36 premières heures d'incubation, 2,6 g.l<sup>-1</sup> sont consommés, la consommation diminue ensuite jusqu'à 96 h d'incubation (0,5 g.l<sup>-1</sup> en 60 h) ; après 96 h d'incubation, la vitesse de consommation augmente (0,885 g.l<sup>-1</sup> en 90 h) et le glucose résiduel est ensuite totalement consommé après 192 h d'incubation.

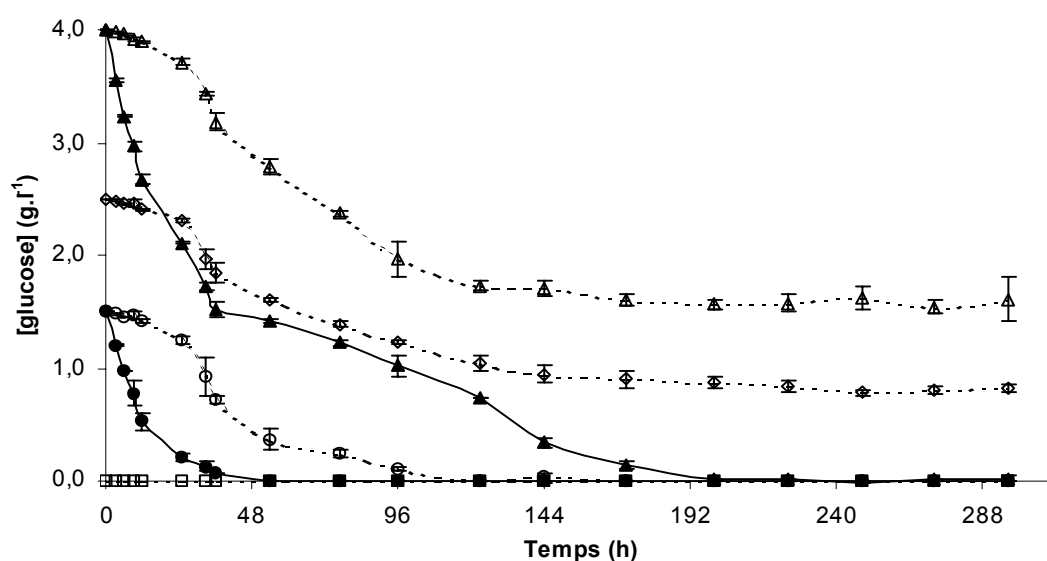


Figure 31 : Evolution de la teneur en glucose à 4 °C en présence de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> en milieu TSB-YE, en absence (-----, symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○, ●), 2,5 (◇) et 4 (Δ, ▲) g.l<sup>-1</sup>

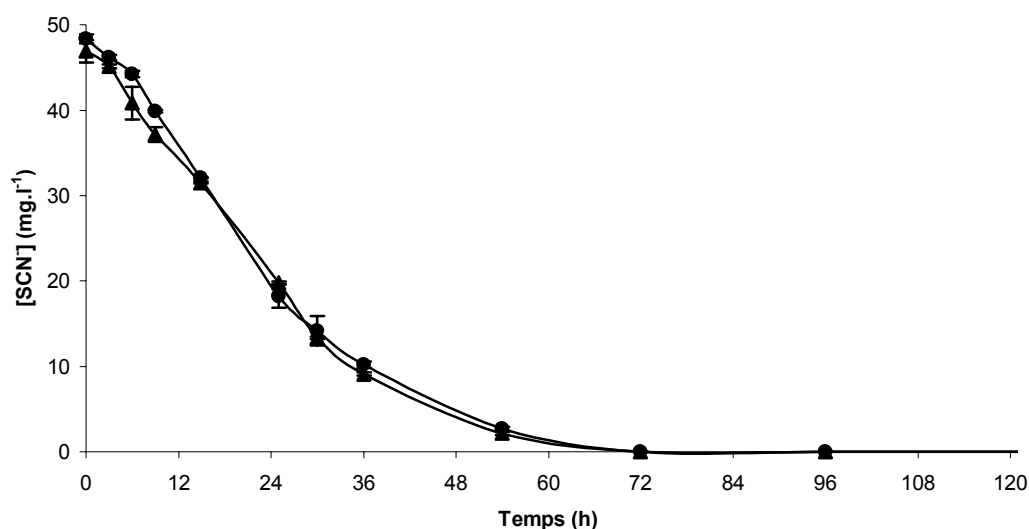


Figure 32 : Evolution de la teneur en SCN<sup>-</sup> en présence du LP-s et de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> à 4 °C avec des concentrations initiales en glucose (g.l<sup>-1</sup>) de 1,5 (●) et de 4 (▲)

❖ La vitesse de peroxydation du SCN<sup>-</sup> n'est pas affectée de manière significative ni par la présence ou par l'absence de la souche, ni par les deux concentrations initiales en glucose (Figure 32). Environ 47 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup> sont peroxydés au cours des 36 premières heures d'incubation. Comme précédemment, le SCN<sup>-</sup> est totalement peroxydé en 72 h d'incubation et



aucune réduction des composés oxydés en  $\text{SCN}^-$  n'est observée jusqu'à la fin de l'incubation (296 h). En présence de LP-s, la croissance modérée de la souche n'a débuté qu'à 72 h, correspondant à la consommation totale du  $\text{SCN}^-$ . L'inhibition est presque totalement levée à 120 h d'incubation à 4 °C.

### *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>

❖ En absence de LP-s, la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> n'est pas affectée de manière significative par les teneurs initiales en glucose comprises entre 0 et 4 g.l<sup>-1</sup> (Figure 33). La population augmente de  $8 \cdot 10^5$  à  $4 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> en 70 h ( $\mu_{\text{max}}$  de 0,098 h<sup>-1</sup> entre 72 et 96 h), pour atteindre en phase stationnaire  $8 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> après 144 h d'incubation.

Le LP-s exerce un effet bactériostatique durant 50 h en présence de 1,5 ou de 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Après 50 h et jusqu'à la fin de l'incubation (296 h), la population augmente lentement pour atteindre un niveau maximal de  $5,4 \cdot 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup> après 192 h d'incubation. Un écart maximum de 3 unités log<sub>10</sub> est noté à 160 h d'incubation entre les populations en absence ou en présence de LP-s. Globalement, l'ajout de LP-s retarde la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> d'environ 50 h à 4 °C et entraîne une population finale inférieure de 2 log<sub>10</sub> à celle de l'essai témoin.

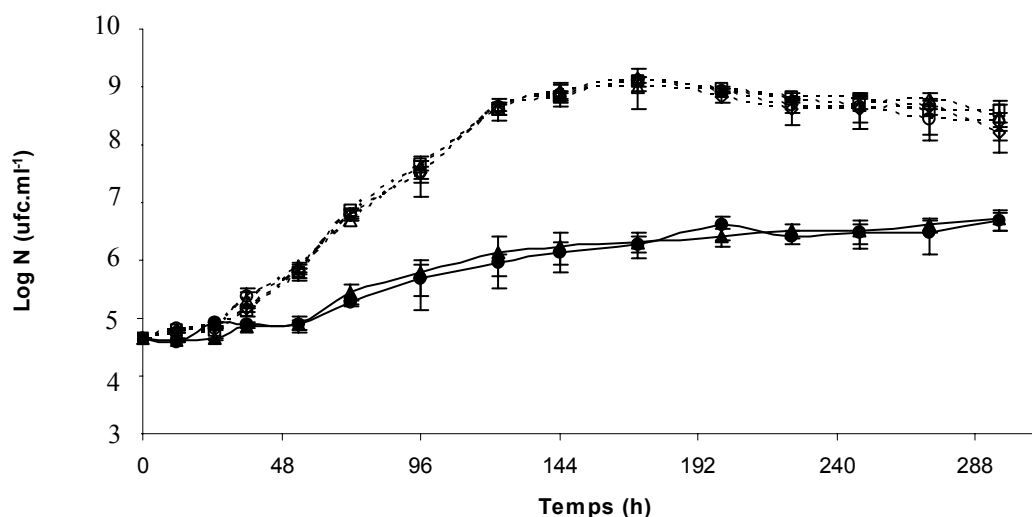


Figure 33 : Croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> à 4 °C en milieu TSB-YE, en absence (....., symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○, ●), 2,5 (◇) et 4 (Δ, ▲) g.l<sup>-1</sup>

❖ En absence de LP-s, la diminution de la valeur du pH, proportionnelle à la teneur initiale en sucre, est uniquement due à la production d'acide lactique (Figure 34). Elle n'apparaît qu'à partir de 122 h d'incubation, lorsque la souche est en fin de croissance exponentielle. Ceci

amène à s'interroger sur le fait que c'est une souche qui produit une grande concentration d'acide lactique et qui est faiblement acidotolérante. En absence de glucose, la diminution des valeurs de pH est faible, de 6,50 à 5,97. Pour les teneurs initiales de 1,5, 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose, entre 120 et 200 h d'incubation, l'acidification est comprise entre 1,4 et 1,9 unité de pH ; après 200 h et jusqu'à la fin de l'incubation (296 h), la variation est très faible, inférieure à 0,4 unité de pH.

En présence de LP-s, la variation des valeurs du pH est faible, environ 0,3 unité de pH pour 1,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Ce résultat est dû au fait que sans LP-s, la diminution est observée lorsque la souche est en phase stationnaire ; or dans les conditions expérimentales en présence du LP-s, la souche n'atteint pas sa phase stationnaire de croissance. L'acide gluconique est l'unique responsable de cette légère acidification. Cette observation est corroborée par une diminution de la valeur du pH de 0,3 unité lorsque le LP-s a été testé en absence de souche, en milieu TSB-YE à 4 °C pendant 296 h.

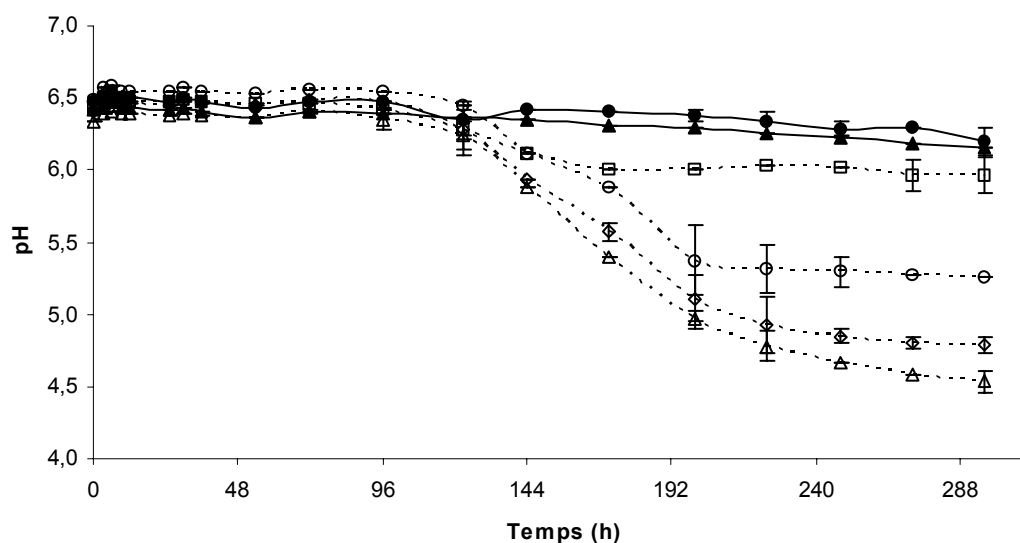


Figure 34 : Evolution de la valeur du pH à 4 °C en présence de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> en milieu TSB-YE, en absence (-----, symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○, ●), 2,5 (◇) et 4 (△, ▲) g.l<sup>-1</sup>

❖ En absence de LP-s, et pour une concentration initiale de 1,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose, la fermentation est quasi constante pendant 120 h d'incubation (1,56 g.l<sup>-1</sup>), où la concentration

résiduelle devient nulle (Figure 35). Pour une concentration de  $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ , entre 0 et 120 h d'incubation, la fermentation est de  $1,6 \text{ g.l}^{-1}$  ; elle diminue entre 120 h et la fin de l'incubation de  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ . Pour une concentration de  $4 \text{ g.l}^{-1}$ , entre 0 et 96 h d'incubation, elle est de  $2,3 \text{ g.l}^{-1}$  ; elle diminue considérablement à partir de 120 h et jusqu'à la fin de l'incubation ( $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ ). A 296 h d'incubation, elle est totale pour le milieu contenant  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose ; elle est de  $1,61$  et de  $1,75 \text{ g.l}^{-1}$  en présence de respectivement  $2,5$  et de  $4 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose, respectivement. La fermentation importante au cours des 120 premières heures d'incubation correspond à la phase de croissance rapide de la souche. Cette forte fermentation aurait dû être en relation avec une baisse du pH.

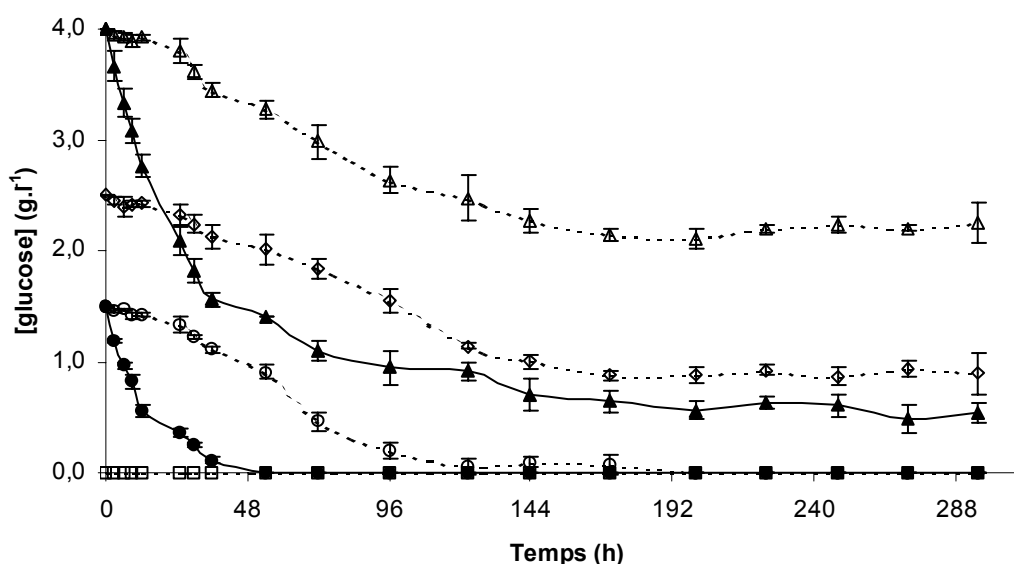


Figure 35 : Evolution de la teneur en glucose à  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en présence de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> en milieu TSB-YE, en absence (---, symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de  $0$  ( $\square$ ),  $1,5$  ( $\circ$ ,  $\bullet$ ),  $2,5$  ( $\diamond$ ) et  $4$  ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ )  $\text{g.l}^{-1}$

En présence du LP-s, la consommation du glucose est plus importante au cours des 36 premières heures d'incubation. Avec  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ , elle est de  $1,44 \text{ g.l}^{-1}$  jusqu'à 18 h d'incubation, puis totale à 48 h. Avec  $4 \text{ g.l}^{-1}$ , la consommation est d'abord de  $2,5 \text{ g.l}^{-1}$  jusqu'à 36 h d'incubation ; elle diminue ensuite jusqu'à 96 h d'incubation ( $0,76 \text{ g.l}^{-1}$ ), et enfin cette consommation tend vers zéro à la fin de l'incubation ( $0,36 \text{ g.l}^{-1}$ ). La consommation de glucose est totale pour le milieu contenant  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose et est partielle ( $3,4 \text{ g.l}^{-1}$ ) en présence de  $4 \text{ g.l}^{-1}$ . L'augmentation de la consommation en glucose lorsque le LP-s est ajouté à la souche est normale car aucune bactéricide n'est observée. La souche survit à la présence de produits

antibactériens et ce glucose consommé conduira simultanément à la production d'acides lactique et gluconique.

❖ La vitesse de peroxydation du thiocyanate n'est affectée de manière significative ni par la présence de la souche ni par les concentrations initiales en excès en glucose (Figure 36). Comme dans le cas des deux souches précédentes, le LP-s fonctionne avec la même vitesse en absence et en présence de la souche. Le  $\text{SCN}^-$  est totalement peroxydé en 72 h d'incubation à 4 °C sans réduction des composés oxydés en  $\text{SCN}^-$  jusqu'à 296 h d'incubation. Aucune reprise de croissance de la souche n'est observée, même en défaut de thiocyanate. Il reste donc suffisamment de produits oxydés dans le milieu afin de limiter la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> pendant 296 h d'incubation à 4 °C.

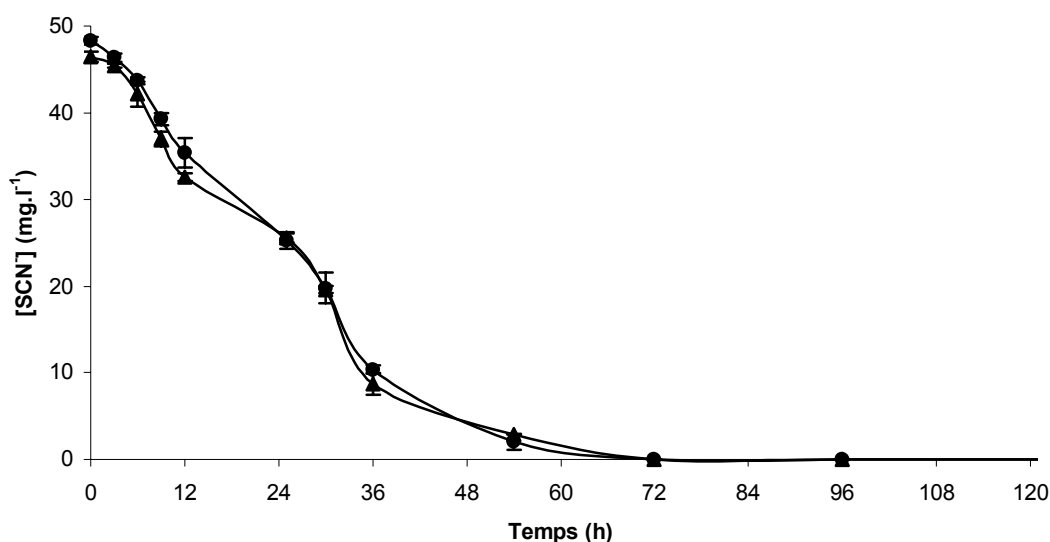


Figure 36 : Evolution de la teneur en  $\text{SCN}^-$  en présence du LP-s et de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> à 4 °C avec des concentrations initiales en glucose de ( $\text{g.l}^{-1}$ ) 1,5 (●) et 4 (▲)

### *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>

❖ En absence de LP-s, la croissance de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> n'est pas affectée de manière significative par les teneurs initiales en glucose comprises entre 0 et 4  $\text{g.l}^{-1}$  (

❖

❖ Figure 37). La croissance de *S. putrefaciens* débute après une phase de latence de 40 h. La population augmente ensuite de  $6.10^4$  à  $9.10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup> en 130 h ( $\mu_{\text{max}}$  de 0,11 h<sup>-1</sup> entre 72 et 96 h) pour atteindre la phase stationnaire de croissance avec  $8.10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>, après 192 h d'incubation.

L'effet bactériostatique du LP-s n'est pas dépendant de la teneur initiale en glucose. Entre 144 et 220 h d'incubation, pendant la phase de croissance plus rapide, la population augmente de  $5,8 \cdot 10^4$  à  $1,1 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>, avec un  $\mu_{\max}$  de  $0,107 \text{ h}^{-1}$  entre 172 et 192 h. Cette valeur de  $\mu_{\max}$  est inférieure à celle calculée en absence de LP-s, de  $0,11 \text{ h}^{-1}$  entre 72 et 96 h d'incubation. En fin de phase exponentielle (220 h d'incubation), la souche entre dans une phase stationnaire de croissance, la variation de la population est inférieure à une unité log, jusqu'à 296 h pour atteindre le même niveau de population que dans les témoins sans LP-s. Entre les conditions de culture, avec et sans inhibiteur, un écart maximum de 3,4 unités log<sub>10</sub> est observé à 132 h d'incubation. L'ajout de LP-s retarde la croissance de *S. putrefaciens* d'environ 120 h à 4 °C.

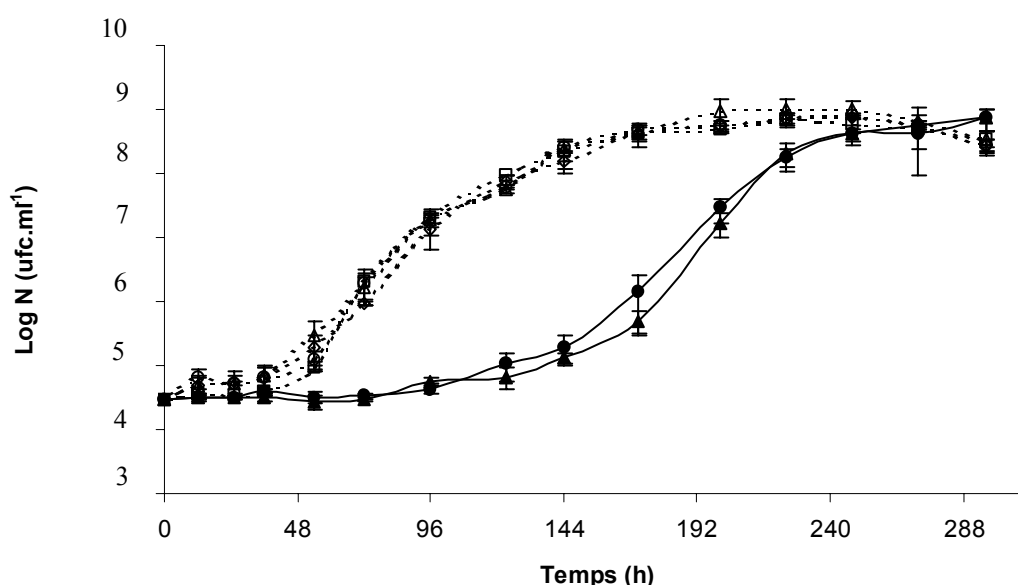


Figure 37 : Croissance de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> à 4 °C en milieu TSB-YE, en absence (-----, symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de 0 (□), 1,5 (○, ●), 2,5 (◇) et 4 (Δ, ▲) g.l<sup>-1</sup>

❖ Dans les différentes conditions expérimentales, aucune différence significative, au cours des trois répétitions, n'est notée dans les valeurs de pH jusqu'à 296 h d'incubation à 4 °C.

❖ En absence de LP-s, la fermentation du glucose est observée jusqu'à 32 h d'incubation, uniquement pendant la phase de latence de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> (Figure 38). La vitesse de fermentation du glucose est d'autant plus rapide que sa concentration initiale est plus élevée avec respectivement 0,96, 1,14 et 1,8 g.l<sup>-1</sup> pour 1,5, 2,5 et 4 g.l<sup>-1</sup> de glucose, sans modification significative de la biomasse. Après 50 h et jusqu'à la fin de l'incubation, la concentration de glucose fermenté n'évolue que très faiblement. Pendant 296 h d'incubation,

elle est environ de  $1,3 \text{ g.l}^{-1}$ , pour les milieux contenant  $1,5$  et  $2,5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose ; elle est de  $1,9 \text{ g.l}^{-1}$  en présence de  $4 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose.

En présence du LP-s, pendant les 24 premières heures d'incubation, les consommations de glucose sont d'autant plus importantes que sa concentration initiale est plus élevée. Le glucose est consommé simultanément par la souche (fermentation) et par le LP-s (oxydation par la GOD). Lorsque la concentration initiale en glucose est de  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ , sa disparition est totale à 50 h d'incubation. En présence de  $4 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose,  $2,1 \text{ g.l}^{-1}$  sont consommés après 24 h d'incubation et  $3 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose en 296 h. Cependant, la consommation de glucose en présence de la souche et du LP-s ( $2,1 \text{ g.l}^{-1}$ ) ne correspond pas à la somme des consommations individuelles de la souche ( $1,9 \text{ g.l}^{-1}$ ) et du LP-s ( $2,07 \text{ g.l}^{-1}$ ). De plus une reprise de la consommation en glucose n'est pas observée lorsque la souche reprend une croissance rapide après 150 h d'incubation. Ceci impliquerait qu'elle utilise une autre source d'énergie présente dans le milieu.

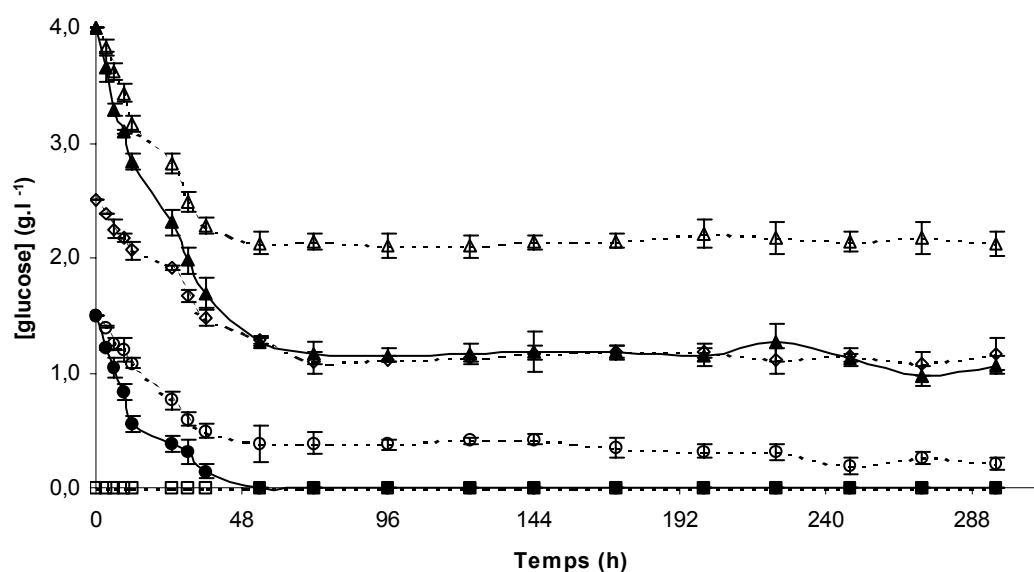


Figure 38 : Evolution de la teneur en glucose à  $4 \text{ °C}$  en présence de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> en milieu TSB-YE, en absence (....., symboles vides) ou en présence de LP-s (—, symboles pleins) avec des concentrations initiales en glucose de  $0$  ( $\square$ ),  $1,5$  ( $\circ$ ,  $\bullet$ ),  $2,5$  ( $\diamond$ ) et  $4$  ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ )  $\text{g.l}^{-1}$

❖ Aucune différence significative de la vitesse de peroxydation du thiocyanate n'est observée pour les différentes concentrations initiales en glucose pendant 100 premières heures d'incubation à  $4 \text{ °C}$  (Figure 39). Le  $\text{SCN}^-$  est totalement peroxydé en 96 h d'incubation. Pendant les 36 premières heures, la vitesse de peroxydation est quasi linéaire ( $40 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Aucune réduction des composés oxydés en  $\text{SCN}^-$  n'est observée jusqu'à 296 h.

En présence de LP-s, la croissance modérée de la souche n'a débuté qu'après la consommation totale du  $\text{SCN}^-$  soit à partir de 96 h d'incubation. L'inhibition est presque totalement levée après 144 h d'incubation à 4 °C. La concentration de produits peroxydés dans le milieu est donc devenue insuffisante pour maintenir un effet bactériostatique sur la croissance de la souche.

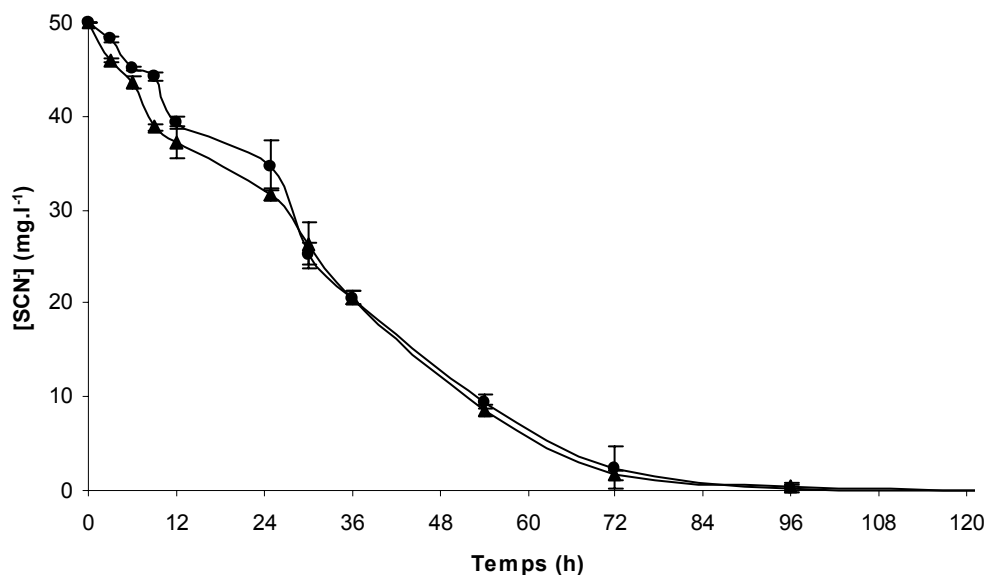


Figure 39 : Evolution de la teneur en  $\text{SCN}^-$  en présence du LP-s et de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> à 4 °C avec des concentrations initiales en glucose de ( $\text{g.l}^{-1}$ ) 1,5 (●) et 4 (▲)

Les trois souches Gram-positives retenues pour cette étude sont très proches d'un point de vue phylogénétique ce qui explique que le LP-s exerce un effet comparable vis-à-vis de ces trois souches. Aucune étude préalable ne traite de l'effet du LP-s sur *B. thermosphacta* ni sur *C. maltaromaticum*. Plusieurs travaux ont montré l'effet antibactérien du système lactoperoxydasique sur des bactéries Gram-positives, et notamment *Listeria monocytogenes*. L'effet varie selon les conditions employées. Une bactériostase a été observée par Denis et Ramet (1989) et Rodriguez *et al.* (1997) qui n'utilisaient pas le même système d'apport de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . D'autres études ont mis en évidence un effet bactériostatique sur la croissance de cette souche (Bibi et Bachmann, 1990 ; Boussouel *et al.*, 2000 ; Kennedy *et al.*, 2000 ; Revol-Junelles *et al.*, 2001 ; Dufour *et al.*, 2003), toujours dans des conditions opératoires variables telles que le mode de production de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , le milieu de culture, les températures d'incubation ou encore les concentrations des différents constituants du LP-s. En général l'effet antibactérien observé sur les bactéries Gram-positives est bactériostatique (Björck, 1982). Malgré l'optimisation des concentrations des composants du LP-s, aucune bactéricidie n'a pu être observé sur les trois souches tests Gram-positives. Mais pour *L. monocytogenes*, la

bactériostase à 25 °C dans le lait a été allongée de 24 h (cf. II.4.) en comparaison avec les études réalisées au laboratoire (Boussouel *et al.*, 2000).

L'impact du LP-s vis-à-vis de *Shewanella putrefaciens* n'a jamais été testé. Néanmoins, des études sur l'effet du LP-s sur la croissance de bactéries Gram-négatives ont révélé des effets bactéricides (Mickelson, 1966 ; Benoy *et al.*, 2000 ; Bosch *et al.*, 2000 ; McLay *et al.*, 2002). La croissance de cette souche n'est pas totalement inhibée par le LP-s mais une longue bactériostase (120 h) est observée. Cet effet bactériostatique sur des souches Gram-négatives est retrouvé dans les travaux de Dufour *et al.* (2003) Cet effet bactériostatique a été observé à 37 et à 42 °C ; or au cours des expérimentations sur les CMI, cette souche s'est avérée être plus résistante à différentes teneurs en agent antibactérien à 4 °C par rapport à 25 °C.

### Résumé

La concentration initiale en glucose, de 1,5 à 4 g.l<sup>-1</sup>, n'a pas d'influence sur le fonctionnement du LP-s ni sur la croissance des différentes souches. De plus, la peroxydation du SCN<sup>-</sup> n'est pas affectée par la présence des souches ; les analyses de peroxydation sont statistiquement toutes identiques (environ 42 mg.l<sup>-1</sup> dans les 36 premières heures d'incubation et un peroxydation totale après 72 h d'incubation).

*L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, comme cela a pu être observé lors des CMI, est la souche la plus sensible au LP-s, avec une bactériostase de 96 h et une population finale de 3.10<sup>6</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>.

*C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> est la souche qui présente la bactériostase la moins longue mais la croissance ne présente pas de phase exponentielle car la population atteinte après 296 h d'incubation est de 2 unités log<sub>10</sub> inférieure à celle obtenue en absence de LP-s.

| Paramètres en présence du LP-s                             | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i><br>DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i><br>CIP 80.40 <sup>T</sup> |
|--|---|---|--|--|
| Durée de la bactériostase (h)                              | 96  | 144   | 48   | 120  |
| Retard maximum de la croissance (unité log <sub>10</sub> ) | 4   | 3,7   | 3  | 3,4  |



|  |                         |                         |                           |                           |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Population finale (ufc.ml<sup>-1</sup>)</b>   | <b>3.10<sup>6</sup></b> | <b>1.10<sup>8</sup></b> | <b>5,4.10<sup>6</sup></b> | <b>1,1.10<sup>8</sup></b> |
| <b>Concentration totale de glucose consommée (g.l<sup>-1</sup>)<br/>(concentrations initiales de 1,5 / 4 g.l<sup>-1</sup>)</b> | <b>1,5 / 3,7</b>        | <b>1,5 / 2,3</b>        | <b>1,5 / 3</b>            | <b>1,5 / 3,4</b>          |

***B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> montrent, de la même manière que lors de l'étude des CMI, une similitude dans la sensibilité à l'agent antibactérien, avec une bactériostase relativement importante (144 et 120 h) et une population, après 296 h d'incubation, identique à celle des témoins.**

#### **Etude de la croissance des souches en culture mixte**

L'activité inhibitrice du LP-s a été testée au cours de deux expérimentations indépendantes, en présence des quatre souches tests en milieu de laboratoire TSB-YE reconstitué sans glucose et avec 1,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose apporté par l'ajout du LP-s, à 4 °C, pendant 296 h d'incubation. La numération de chaque souche a été réalisée sur les milieux sélectifs sélectionnés. L'analyse a été conduite en absence ou en présence du LP-s optimisé (Figure 40).

La croissance de chacune des souches, en culture mixte, en absence de LP-s, est quasiment identique à celle observée en culture pure. Les  $\mu_{\max}$  obtenus, lors de la phase exponentielle, en culture pure et en culture mixte sont respectivement de 0,095 et 0,089 h<sup>-1</sup> pour *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, 0,101 et 0,096 h<sup>-1</sup> pour *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, 0,098 et 0,095 h<sup>-1</sup> pour *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> et 0,11 et 0,14 h<sup>-1</sup> pour *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. Cette comparaison montre que la croissance de chaque souche n'est pas modifiée par la présence des trois autres souches.

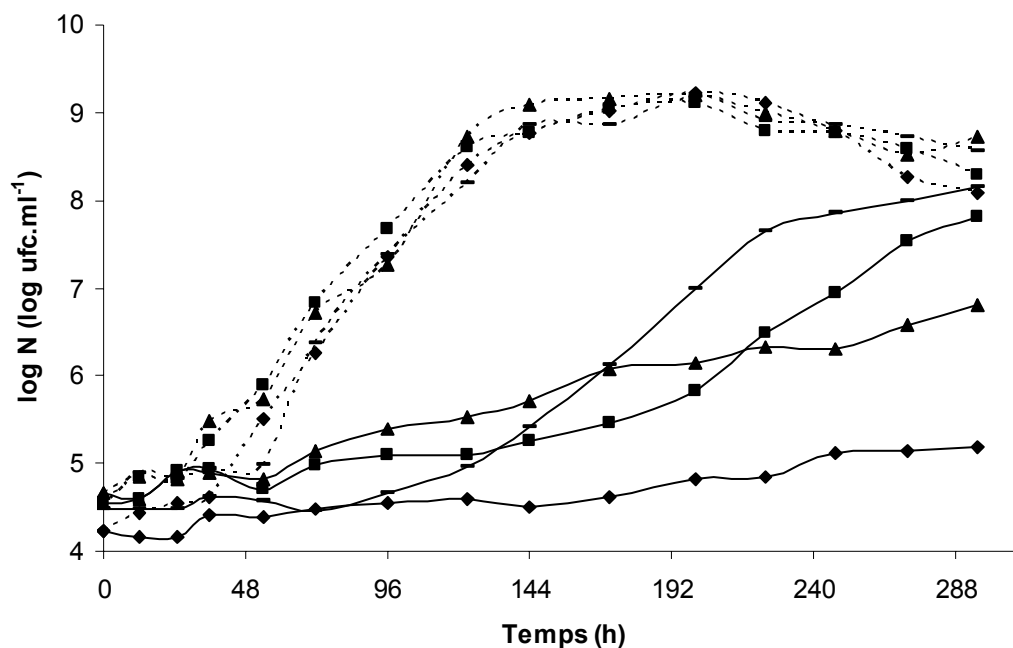


Figure 40 : Croissance en culture mixte des quatre souches tests en milieu TSB-YE à 4 °C en absence ou en présence de LP-s en absence (.....) ou en présence (—) de LP-s *Listeria monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> (◆), *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> (■), *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> (▲) et *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> (—).

La croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est la plus affectée en culture mixte en présence de LP-s. Dans ces conditions, la population finale atteinte après 296 h d'incubation est de  $1,5 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup> pour une population initiale de  $1,7 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup> ; un écart maximum de niveaux de population entre les témoins et les essais est de 4,3 unités log<sub>10</sub> à 144 h d'incubation. Alors qu'en culture pure en présence de LP-s, le population augmente de 2 unités log<sub>10</sub> au cours des 296 h d'incubation, en culture mixte la différence de niveaux de population est inférieure à 1 unité log<sub>10</sub>.

En culture mixte et en présence d'inhibiteur, la population finale de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> après 296 h d'incubation est de  $6,5 \cdot 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup>, avec un témoin sans LP-s présentant un niveau de population de  $1,9 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Une bactériostase est observée pendant les 168 premières heures d'incubation. Elle est de 144 h d'incubation lorsque la croissance de la souche est étudiée en culture pure. L'écart maximum de niveaux de population entre les témoins et les essais sont identiques en cultures pure et mixte, 3,7 unités log<sub>10</sub> à 150 h d'incubation. De même que pour *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, la croissance de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> en culture mixte est plus ralentie par la présence du LP-s.

*C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> ne présente aucune phase de croissance exponentielle. La croissance modérée permet d'atteindre à la fin du temps d'incubation une population finale de

$6,3 \cdot 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup> avec un écart maximum de niveaux de population de 3,2 unités log<sub>10</sub> après 120 h d'incubation. Cette souche présente une sensibilité presque similaire au LP-s, en culture pure et en culture mixte. Les populations finales ( $5,4 \cdot 10^6$  et  $6,3 \cdot 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup>) et des écarts de niveaux de population entre les témoins et les essais (3 et 3,2 unités log<sub>10</sub>) sont quasi identiques. Cependant l'écart maximum entre les essais et les témoins est observé 40 h plus tôt en culture mixte qu'en culture pure.

En présence de LP-s et en culture mixte, un ralentissement de la croissance de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est observé pendant 120 h. Le  $\mu_{\max}$  obtenu lors de la phase exponentielle de croissance est plus faible (0,082 h<sup>-1</sup>) et la population finale est la même que celle obtenue en absence de LP-s,  $1,4 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>. L'écart maximum entre les niveaux de population des témoins et des essais est de 3,2 unités Log<sub>10</sub>. L'effet du LP-s sur la croissance de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est similaire à celui observé en culture pure : la bactériostase est longue mais le niveau de population est identique à celui du témoin après 296 h d'incubation. Néanmoins, l'effet antibactérien est accentué en culture mixte car le  $\mu_{\max}$  obtenu lors de la culture pure était plus élevé, de 0,107 h<sup>-1</sup>.

❖ En culture mixte et en présence du LP-s, la consommation du glucose est totale après 40 h d'incubation avec une très forte consommation dans les 32 premières d'incubation (1,4 g.l<sup>-1</sup>). Cette consommation est plus rapide que dans les conditions de cultures pures où en moyenne 1,36 g.l<sup>-1</sup> de glucose sont consommés dans les 36 premières heures d'incubation et cette consommation est totale après, en moyenne, 48 h d'incubation. La croissance des souches n'est pas affectée par la présence ou l'absence de glucose, c'est pourquoi la consommation du glucose n'est pas plus importante en culture mixte.

❖ La peroxydation du thiocyanate en culture pure, en moyenne de 40 mg.l<sup>-1</sup> au cours des 36 premières heures, est totale après 72 h d'incubation. En culture mixte, cette peroxydation est plus importante, 43 mg.l<sup>-1</sup> dans les 30 premières heures, et elle est totale après 50 h d'incubation. Dans le cas d'une culture mixte, le fonctionnement du LP-s est affecté par la présence des souches, ce qui se justifie par une plus importante utilisation de l'agent antibactérien, produit final du système.

❖ En culture mixte en milieu TSB-YE, la variation du pH est assez complexe à interpréter car elle reflète la croissance ou la survie des quatre souches ensemble en présence ou en absence de LP-s (Figure 41).

En absence de LP-s, la valeur du pH obtenue est plus faible que toutes les valeurs obtenues en culture pure ce qui est dû aux produits des métabolismes des différentes souches, principalement à l'acide lactique.

En présence du LP-s optimisé, après 296 h d'incubation, une acidification de une unité de pH est observée. Cette diminution est due au système lui-même (l'acide gluconique) mais essentiellement à l'acide lactique produit par les croissances, même modérées, de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> et surtout de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. La différence entre les deux variations de pH est représentative de l'inhibition, plus ou moins importante, de la croissance des différentes souches.

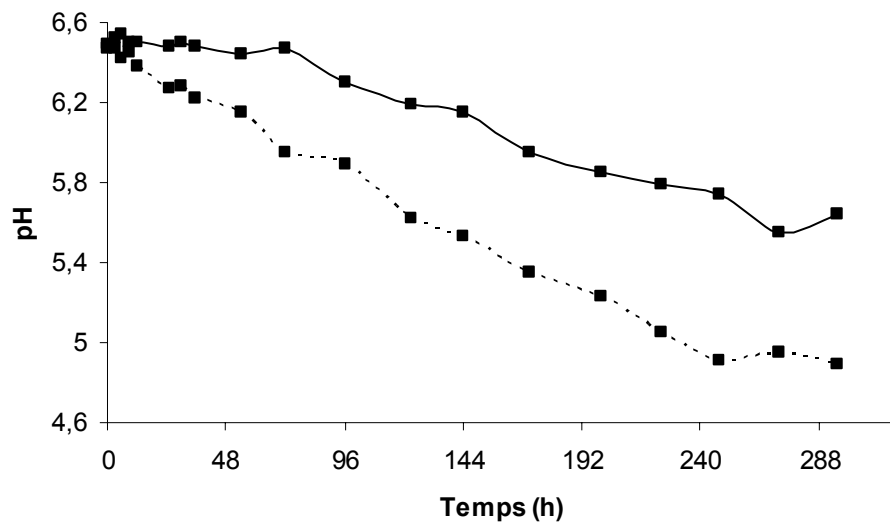


Figure 41 : Evolution du pH en présence ou en absence de LP-s en présence des quatre souches à 4 °C en TSB-YE

L'évolution du pH est suivie en absence (.....) ou en présence (—) de LP-s et en présence des quatre cibles de l'étude : *Listeria monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> et *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>.

## Résumé

Seule *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> présente une bactériostase plus longue en culture mixte à 4 °C. Les trois autres souches ont des comportements similaires en cultures pures et en culture mixte à 4 °C. De même que lors des cultures pures, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> sont les deux souches dont la population finale est proche de celle des témoins.

| Paramètres en présence du LP-s                                | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i><br>DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i><br>CIP 80.40 <sup>T</sup> |
|---|---|---|--|--|
| Durée de la bactériostase (h)                                 | 296   | 168   | 60   | 120  |
| Retard maximum de la croissance<br>(unité log <sub>10</sub> ) | 4,3   | 3,7   | 3,2  | 3,2  |
| Population finale (ufc.ml <sup>-1</sup> )                     | 1,5.10 <sup>5</sup>                               | 6,5.10 <sup>7</sup>                               | 6,3.10 <sup>6</sup>                                | 1,4.10 <sup>8</sup>                              |

L'acidification du milieu est plus importante en culture mixte, en absence ou en présence du LP-s ; elle résulte de la production, par les quatre souches, de métabolites acidifiants, dont l'acide lactique. La consommation du glucose est plus rapide en culture mixte.

Le LP-s a une activité plus importante en présence des souches en cultures mixtes ; la vitesse de peroxydation du SCN<sup>-</sup> est plus rapide. Lors de l'étude des CMI, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> s'est avérée être la souche la plus sensible au LP-s. La vitesse de peroxydation plus importante peut être à l'origine du ralentissement de sa croissance en culture mixte.

### III.2. Etude sur milieu modèle

Les expérimentations conduites en tampon et en milieu TSB-YE ont permis de comprendre le fonctionnement du LP-s optimisé et de tester son effet inhibiteur sur les quatre souches tests, en cultures pures et en cultures mixtes. Afin de se rapprocher des conditions expérimentales d'une matrice alimentaire, un milieu modèle poisson a été créé, et l'activité du LP-s sur les souches a été testée, en cultures pures et en cultures mixtes.

Les expérimentations sont réalisées à 4 °C sans agitation, en présence ou en absence du LP-s optimisé, en présence ou en absence de chacune ou des quatre souches tests de l'étude, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>. Le LP-s optimisé est composé de 85,5 UI.l<sup>-1</sup> de GOD, 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de glucose, de 50 mg.l<sup>-1</sup> de SCN<sup>-</sup> et 3930 UI.l<sup>-1</sup> de LPO à une valeur initiale de pH de 6,5. Toutes les analyses ont été réalisées en double.

### III.2.1. Mise au point du milieu

Trois modes opératoires pour la mise au point du milieu « poisson » ont été testés (Figure 42) afin de déterminer celui qui sera utilisé pour estimer l'efficacité du LP-s dans le poisson. Le milieu retenu doit être le plus homogène possible afin d'avoir une bonne répartition des différents composants du LP-s et de permettre des analyses microbiologiques et biochimiques les plus représentatives possibles.

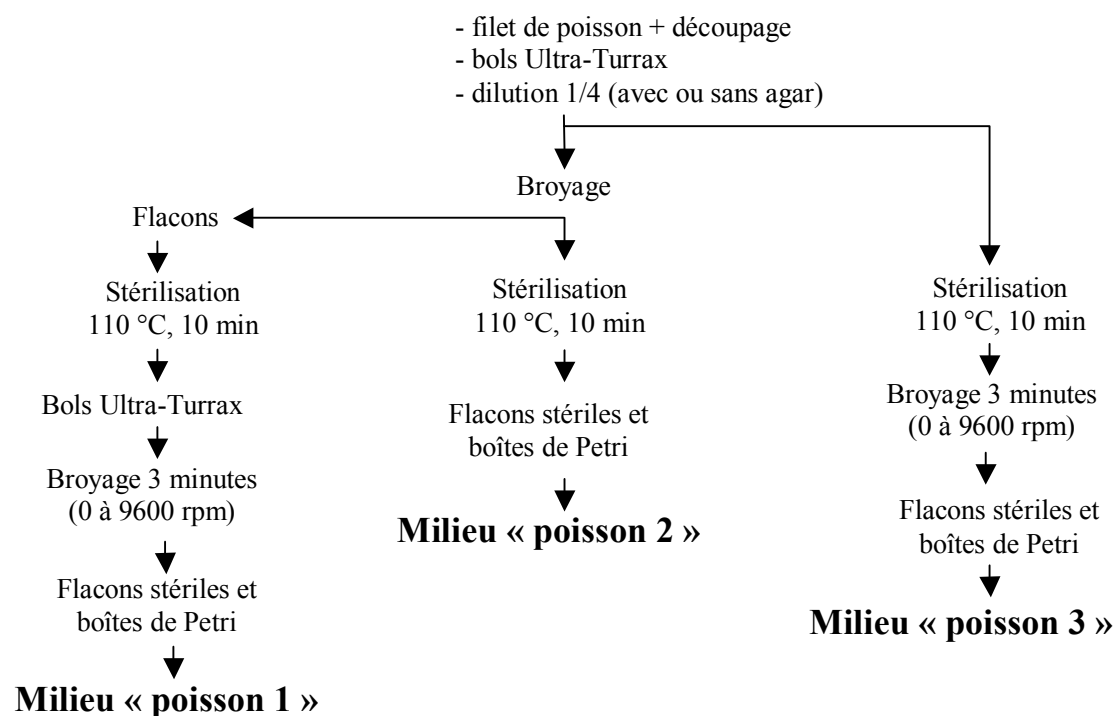


Figure 42 : Schéma des modes opératoires suivis pour mettre au point un milieu modèle poisson

Après la stérilisation, la chair des milieux 1 et 2 a subi une synérèse et se présente sous forme de blocs compacts. Le milieu 2 a un aspect très hétérogène avec des morceaux de chair assez importants. Le milieu 1, malgré un broyage après la stérilisation, a un aspect visuel hétérogène, qui s'accroît lors des dépôts en boîtes de Petri. Le milieu 3 n'a pas subi de broyage avant la stérilisation, et le poisson est uniquement découpé en petits morceaux. Après la stérilisation, la chair qui n'a subi qu'une faible synérèse, est broyée à l'Ultra-Turax. Le milieu obtenu alors présente un aspect homogène, aussi bien à l'état liquide qu'à l'état gélifié. Le pH de ce milieu est de 6,7. Sa composition en acides gras est détaillée dans la partie III.2.6. La composition en acides gras des filets de poissons frais avant la mise au point du milieu est de (%) : 4,20 d'acide myristique, 0,18 d'acide myristoléique, 0,32 d'acide Cis-10-pentadécénoïque, 14,60 d'acide palmitique, 5,81 d'acide palmitoléique, 0,69 d'acide

margarique, 29,74 d'acide stéarique, 3,51 d'acide oléique, 7,33 d'acide linoléique, 2,65 d'acide 7,9,12,15-octadecatétranoïque, 5,41 d'acide cis-11-eicosénoïque, 7,32 d'acide cis-11-docosénoïque et 11,07 d'acide 8,11,14,17,19-docosapentaénoïque. La différence la plus importante est notée pour l'acide oléique qui est presque sous forme de trace dans le milieu modèle ce qui n'est pas le cas dans les filets de poissons non traités.

### III.2.2. Dosage du thiocyanate ajouté dans le poisson

Le dosage du thiocyanate a dû être ajusté en fonction de la nature du milieu modèle, opaque et hétérogène. Le problème est lié à la présence de protéine dans le milieu et a été résolu grâce à l'adaptation d'un dosage d'extraction des protéines dans le lait à base de TCA. Plusieurs paramètres sont testés afin de mettre au point le meilleur dosage (Tableau 19). Le volume initial de  $\text{SCN}^-$ , le moment de l'ajout du TCA, les différentes concentrations de TCA, la dilution de l'échantillon. Le seuil de sensibilité, la reproductibilité et la répétabilité de la méthode ont été analysés. Dans tous les cas, les concentrations en  $\text{SCN}^-$  utilisées sont de 10, 20, 30, 40 et 50  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Afin de pouvoir comparer les différentes conditions, un taux de récupération est calculé dans chaque cas. Les essais sont réalisés en triple.

| Conditions opératoires   |               | Taux de récupération (%) |
|--|---------------|--------------------------|
| Volumes initiaux de la solution de $\text{SCN}^-$ (ml)             | 5             | 59,9 - 78                |
|  | 1,25          | 55,1 - 73,1              |
| Concentrations de la solution en TCA (%)                           | 5             | 44,1 - 53,2              |
|  | 20            | 55 - 72                  |
| Dilutions de l'échantillon   | 4/5           | 40,4 - 46,3              |
|  | 2/3           | 35 - 48                  |
|  | 1/2           | 55,1 - 73,1              |
| Moment de l'ajout du TCA   | Avant broyage | 55,1 - 73,1              |
|  | Après broyage | 51,36 - 63               |
| Concentrations initiales en $\text{SCN}^-$ ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) | 2             | 90                       |
|  | 4             | 58,5                     |
|  | 6             | 59                       |
|  | 8             | 57                       |
|  | 10            | 68                       |

Tableau 19: Différentes conditions expérimentales testées pour la mise au point du dosage du  $\text{SCN}^-$  dans le poisson

TCA : acide trichloroacétique

Les taux de récupération varient de 55,1 % à 73,1 % pour volume initial de  $\text{SCN}^-$  de 1,25 ml et de 59,9 % à 78 % pour 5 ml. Le volume initial de la solution de  $\text{SCN}^-$  n'a donc pas d'influence sur la récupération de ce composé dans le surnageant.

Dans la deuxième série d'expériences, deux concentrations en TCA ont été ajoutées avant broyage du poisson. Les pourcentages de récupération du  $\text{SCN}^-$  sont plus importants avec l'ajout de TCA à 20 % (p/v) comparativement à l'ajout de TCA à 5 % (p/v). En effet, pour des mêmes gammes de concentrations, le taux de récupération varie de 55 % à 72 % avec du TCA à 20 % (p/v) alors qu'avec l'ajout de TCA à 5 % (p/v), il est de 44-53 %. Une concentration de 20 % de TCA permet donc une meilleure extraction du  $\text{SCN}^-$ .

La dilution du poisson par du TCA à 20 % (p/v) influence les pourcentages de récupération. Dans le cas de la dilution au 1/2, les taux de récupération en  $\text{SCN}^-$  varient entre 55,1 et 73,1 %. Pour les dilutions plus faibles, 2/3 et 4/5, les pourcentages de récupération sont moins importants. En effet, pour une dilution au 2/3, ces valeurs varient de 35 à 48 %, et pour la dilution au 4/5, entre 40 et 46 %. La dilution au 1/2 a été retenue pour la suite des expériences.

Le moment de l'ajout de TCA modifie également les résultats. L'ajout avant broyage d'une solution de TCA à 20 % (p/v) permet un taux de récupération qui varie entre 55,1 et 73,1 %. Si l'ajout est réalisé après broyage, ce taux varie entre 42 et 63 %. La condition opératoire retenue a été l'ajout de TCA à 20 % (p/v) avant broyage, car le TCA est mieux répartie dans la chair du poisson pendant le broyage.

Le seuil de détection a été testé à partir de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de  $\text{SCN}^-$ . En utilisant une solution de TCA à 20 % (p/v), le taux de récupération varie entre 55,1 et 73,1 %. Pour des concentrations plus faibles, inférieures à  $10 \text{ mg./kg}^{-1}$ , ce taux varie entre 57 et 90 %. Le seuil minimal de détection du  $\text{SCN}^-$  est de  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

### ***Résumé***

**Le milieu modèle a été créé à partir de filets de truites arc-en-ciel. Ils sont d'abord découpés en petits morceaux, placés dans des bols d'Ultra-Turax et dilués au 1/4 avec de l'eau distillée. Les bols et leur contenu sont stérilisés à 110 °C pendant 10 min. Le poisson est ensuite broyé pendant 3 min à l'Ultra-Turax. Ce milieu modèle peut être utilisé sous forme liquide ou gélosée par un ajout d'agar ( $12 \text{ g.l}^{-1}$ ) avant la stérilisation.**



**Pour le dosage du  $\text{SCN}^-$  ajouté dans le poisson et dans le milieu « modèle », la solution de TCA à 20 % est ajoutée à l'échantillon en réalisant une dilution au  $\frac{1}{2}$  avant le broyage à l'Ultra-Turax. Le seuil de détection de la méthode est de  $2 \text{ mg } \text{SCN}^- \cdot \text{kg}^{-1}$ . La méthode peut être considérée comme répétable et reproductible.**

### III.2.3. Fonctionnement du système lactoperoxydasique

Les expériences ont été réalisées en triple, en milieu TSB-YE reconstitué et en milieu modèle en présence du LP-s optimisé. L'évolution des teneurs en  $\text{SCN}^-$ , en glucose, l'indice de peroxyde et la valeur du pH sont suivies pendant 144 h d'incubation à  $4^\circ\text{C}$ .

Dans ces deux milieux, les valeurs de pH diminuent de manière constante en raison de la production d'acide gluconique par le LP-s ; cette acidification est plus importante dans le milieu modèle, la pH évolue de 6,71 à 6,34, comparativement au milieu TSB-YE, où le pH initial de 6,50 est de 6,41 après 144 h d'incubation.

Le dosage du glucose n'a pas pu être adapté au milieu modèle car les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles et les écarts types étaient beaucoup trop importants. Trois types de dosages du glucose, basés sur la réaction avec l'o-dianisidine, ont été testés mais aucun n'a permis une mesure fine, reproductible et répétable.

La concentration initiale en  $\text{SCN}^-$  est de  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . La vitesse de peroxydation est ralentie par la présence d'une matrice complexe telle que celle du milieu modèle (Figure 43). En effet la vitesse de peroxydation du  $\text{SCN}^-$  est de  $0,31 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pendant 120 h d'incubation en milieu modèle alors qu'elle est 3,5 fois plus rapide sur un laps de temps inférieur en milieu, TSB-YE

(1,14 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> en 36 h d'incubation). Cette différence est probablement due à la complexité

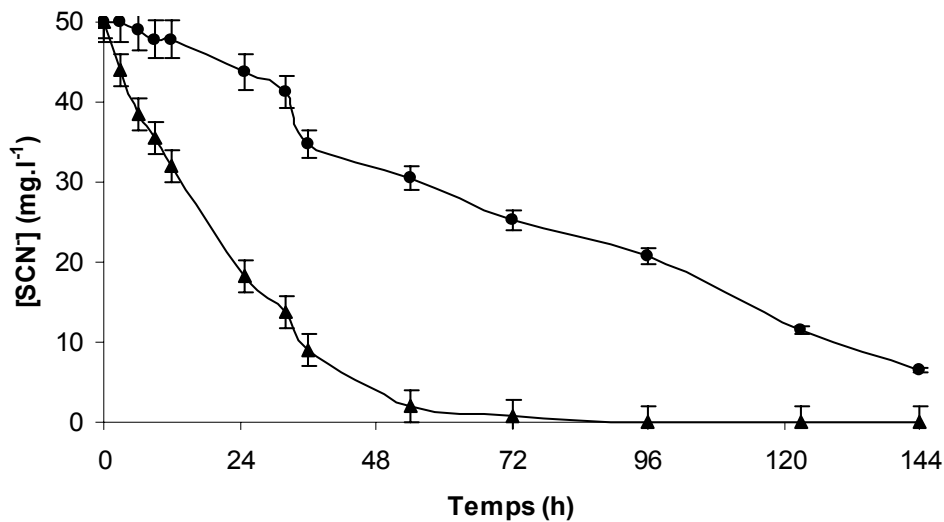


Figure 43 : Variation de la teneur en SCN<sup>-</sup> en présence du LP-s optimisé à 4 °C, en milieu TSB-YE (▲) et en milieu modèle (●), en absence ou en présence d'une ou de toutes les souches tests

du milieu modèle qui ne permet pas une bonne proximité de tous les composants du LP-s et aussi à la possibilité de perte de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vers d'autres composants du milieu modèle tels que les lipides.

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, l'indice de peroxyde a été mesuré en milieu TSB-YE, en milieu modèle et en tampon phosphate pH 6,5 (Figure 44). En absence de LP-s, le taux éventuel de peroxyde présent dans les milieux n'est pas détectable.

La concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libre dans le tampon et dans le milieu de laboratoire TSB-YE est statistiquement la même. Dans ces milieux la peroxydation du SCN<sup>-</sup> est arrêtée à 48 h d'incubation ce qui n'est pas le cas dans le milieu modèle.

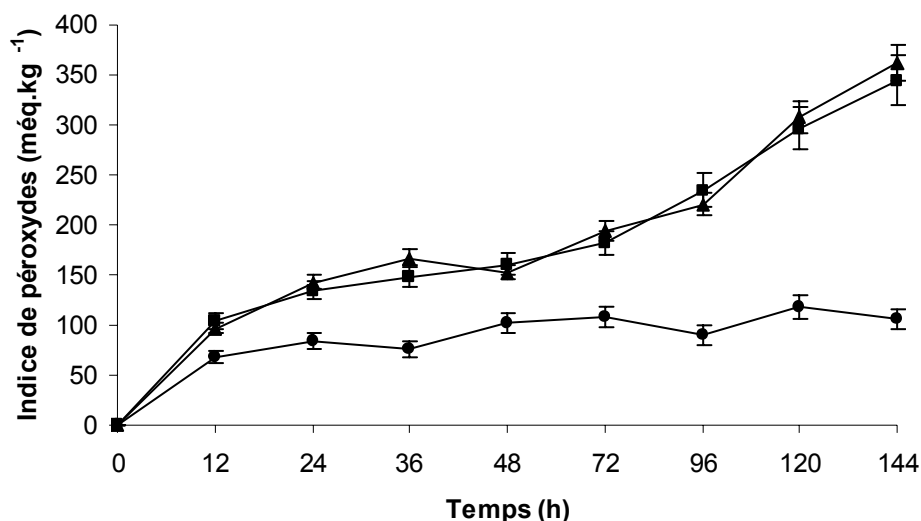


Figure 44 : Evolution de la concentration résiduelle en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu TSB-YE (▲), en milieu modèle (●) et en tampon phosphate pH 6,5 (■)

Lorsque le LP-s est introduit dans du tampon phosphate ou du milieu de laboratoire, au cours des 14 premières heures d'incubation,  $7 \text{ m}\ddot{\text{e}}\text{q}.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  sont produits. Cela correspond à la production massive du peroxyde d'hydrogène par le système glucose/GOD et à son utilisation par la LPO. La production de peroxyde d'hydrogène est supérieure à sa consommation par la LPO, le système est en excès de ce produit/substrat. Un plateau de production de  $1,4 \text{ m}\ddot{\text{e}}\text{q}.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  est observé jusqu'à environ 54 heures d'incubation, suivi d'une augmentation,  $2,5 \text{ m}\ddot{\text{e}}\text{q}.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , qui correspond à l'épuisement du  $\text{SCN}^-$  dans le milieu et à l'arrêt de l'utilisation par le LP-s.

Lorsque le LP-s est introduit dans le milieu modèle,  $4,9 \text{ m}\ddot{\text{e}}\text{q}.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  sont présents pendant les 14 premières heures, puis l'IP est stabilisé à  $100 \text{ m}\ddot{\text{e}}\text{q}.\text{kg}^{-1}$  jusqu'à la fin de l'incubation. Dans le cas du milieu modèle, le  $\text{SCN}^-$  n'est pas totalement consommé à la fin de l'incubation. Cet écart, de 36 à  $254 \text{ m}\ddot{\text{e}}\text{q}.\text{kg}^{-1}$ , est lié au fonctionnement du LP-s ; la concentration de  $\text{SCN}^-$  peroxydée est plus importante en tampon ou en milieu TSB-YE qu'en milieu modèle.

#### III.2.4. Comparaison de la croissance des souches sur milieu TSB-YE et sur milieu modèle

Les expériences ont été réalisées en triple en absence de LP-s en milieu TSB-YE (pH initial de 6,50) et en milieu modèle (pH initial de 6,71). Trois températures d'incubation ont été choisies :  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (température usuelle de conservation des aliments),  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  (température maximale de réfrigération tolérée) et la température optimale de chaque souche test,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$

pour *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, 25 °C pour *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> et 30 °C pour *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> (Tableaux 21 à 24). Les croissances bactériennes sont suivies pendant 150 h.

| Milieu | T (°C) | P <sub>f</sub> (ufc.ml <sup>-1</sup> )    | T <sub>pf</sub> (h) | μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> ) | pH <sub>f</sub> |
|--------|--------|---|---------------------|-------------------------------------|-----------------|
| TSB-YE | 4      | 6,0.10 <sup>8</sup> ± 1,2.10 <sup>7</sup> | 105,6 ± 1,4         | 0,11 ± 0,01                         | 5,52 ± 0,05     |
|        | 8      | 5,8.10 <sup>8</sup> ± 1,7.10 <sup>7</sup> | 87,7 ± 1,0          | 0,19 ± 0,02                         | 5,50 ± 0,05     |
|        | 37     | 6,6.10 <sup>8</sup> ± 1,5.10 <sup>7</sup> | 9,7 ± 0,7           | 0,78 ± 0,01                         | 5,32 ± 0,06     |
| modèle | 4      | 6,4.10 <sup>8</sup> ± 1,6.10 <sup>7</sup> | 112,5 ± 1,0         | 0,10 ± 0,02                         | 6,43 ± 0,04     |
|        | 8      | 6,1.10 <sup>8</sup> ± 1,2.10 <sup>7</sup> | 90,1 ± 1,3          | 0,21 ± 0,02                         | 6,55 ± 0,05     |
|        | 37     | 6,4.10 <sup>8</sup> ± 1,8.10 <sup>7</sup> | 10,4 ± 0,6          | 0,71 ± 0,01                         | 6,54 ± 0,04     |

Tableau 20 : Comparaison de la croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> sur milieu TSB-YE et sur milieu modèle à 4, 8 et 37 °C

La population initiale est de 1,7.10<sup>4</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>.

T : température d'incubation ; P<sub>f</sub> : population finale ; T<sub>pf</sub> : temps nécessaire pour atteindre la population finale ; pH<sub>f</sub> : pH final.

| Milieu | T (°C) | P <sub>f</sub> (ufc.ml <sup>-1</sup> )    | T <sub>pf</sub> (h) | μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> ) | pH <sub>f</sub> |
|--------|--------|---|---------------------|-------------------------------------|-----------------|
| TSB-YE | 4      | 7,4.10 <sup>8</sup> ± 1,9.10 <sup>7</sup> | 114,3 ± 1,2         | 0,11 ± 0,02                         | 5,80 ± 0,05     |
|        | 8      | 7,4.10 <sup>8</sup> ± 1,1.10 <sup>7</sup> | 91,7 ± 1,4          | 0,14 ± 0,02                         | 5,74 ± 0,08     |
|        | 25     | 7,3.10 <sup>8</sup> ± 1,4.10 <sup>7</sup> | 9,4 ± 0,3           | 0,65 ± 0,01                         | 5,42 ± 0,07     |
| modèle | 4      | 7,3.10 <sup>8</sup> ± 1,3.10 <sup>7</sup> | 122,2 ± 1,3         | 0,11 ± 0,02                         | 6,81 ± 0,03     |
|        | 8      | 7,1.10 <sup>8</sup> ± 1,8.10 <sup>7</sup> | 88,9 ± 1,6          | 0,19 ± 0,02                         | 6,71 ± 0,05     |
|        | 25     | 7,7.10 <sup>8</sup> ± 1,9.10 <sup>7</sup> | 10,5 ± 0,9          | 0,60 ± 0,01                         | 6,52 ± 0,06     |

Tableau 21 : Comparaison de la croissance de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> sur milieu TSB-YE et sur milieu modèle à 4, 8 et 25 °C

La population initiale est de 3,5.10<sup>4</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>.

T : température d'incubation ; P<sub>f</sub> : population finale ; T<sub>pf</sub> : temps nécessaire pour atteindre la population finale ; pH<sub>f</sub> : pH final.

| Milieu | T (°C) | P <sub>f</sub> (ufc.ml <sup>-1</sup> )    | T <sub>pf</sub> (h) | μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> ) | pH <sub>f</sub> |
|--------|--------|---|---------------------|-------------------------------------|-----------------|
| TSB-YE | 4      | 2,3.10 <sup>8</sup> ± 1,5.10 <sup>7</sup> | 110,2 ± 0,8         | 0,10 ± 0,01                         | 5,10 ± 0,06     |
|        | 8      | 2,4.10 <sup>8</sup> ± 1,1.10 <sup>7</sup> | 101,5 ± 0,3         | 0,13 ± 0,01                         | 5,07 ± 0,05     |
|        | 30     | 1,9.10 <sup>8</sup> ± 2,1.10 <sup>7</sup> | 12,6 ± 0,7          | 0,80 ± 0,02                         | 5,03 ± 0,03     |
| modèle | 4      | 3,1.10 <sup>8</sup> ± 1,6.10 <sup>7</sup> | 119,5 ± 1,1         | 0,11 ± 0,02                         | 6,40 ± 0,06     |
|        | 8      | 2,9.10 <sup>8</sup> ± 1,5.10 <sup>7</sup> | 98,7 ± 1,0          | 0,18 ± 0,02                         | 6,67 ± 0,04     |
|        | 30     | 2,9.10 <sup>8</sup> ± 1,9.10 <sup>7</sup> | 13,8 ± 0,6          | 0,72 ± 0,02                         | 6,73 ± 0,04     |

Tableau 22 : Comparaison de la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> sur milieu TSB-YE et sur milieu modèle à 4, 8 et 30 °C

La population initiale est de 4,5.10<sup>4</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>.

T : température d'incubation ; P<sub>f</sub> : population finale ; T<sub>pf</sub> : temps nécessaire pour atteindre la population finale ; pH<sub>f</sub> : pH final.

| Milieu | T (°C) | P <sub>f</sub> (ufc.ml <sup>-1</sup> )    | T <sub>pf</sub> (h) | μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> ) | pH <sub>f</sub> |
|--------|--------|---|---------------------|-------------------------------------|-----------------|
| TSB-YE | 4      | 4,2.10 <sup>8</sup> ± 1,4.10 <sup>7</sup> | 122,4 ± 1,9         | 0,10 ± 0,01                         | 6,45 ± 0,06     |
|        | 8      | 4,4.10 <sup>8</sup> ± 1,4.10 <sup>7</sup> | 97,6 ± 1,9          | 0,20 ± 0,02                         | 6,43 ± 0,03     |
|        | 25     | 3,9.10 <sup>8</sup> ± 2,0.10 <sup>7</sup> | 11,5 ± 0,8          | 0,87 ± 0,02                         | 6,37 ± 0,05     |
| modèle | 4      | 5,2.10 <sup>8</sup> ± 1,6.10 <sup>7</sup> | 123 ; 4 ± 1,6       | 0,10 ± 0,02                         | 7,43 ± 0,03     |
|        | 8      | 5,1.10 <sup>8</sup> ± 1,7.10 <sup>7</sup> | 110,2 ± 1,2         | 0,18 ± 0,01                         | 7,50 ± 0,04     |
|        | 25     | 5,2.10 <sup>8</sup> ± 1,9.10 <sup>7</sup> | 12,6 ± 0,4          | 0,81 ± 0,02                         | 7,58 ± 0,04     |

Tableau 23 : Comparaison de la croissance de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>1</sup> sur milieu TSB-YE et sur milieu modèle à 4, 8 et 25 °C

La population initiale est de 3,4.10<sup>4</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>.

T : température d'incubation ; P<sub>f</sub> : population finale ; T<sub>pf</sub> : temps nécessaire pour atteindre la population finale ; pH<sub>f</sub> : pH final.

Dans tous les cas, les souches ont des comportements cultureux quasiment similaires sur ces deux milieux. En effet, les populations finales obtenues, le temps pour les atteindre et donc les μ<sub>max</sub> calculés sont statistiquement proches. Seules les variations de pH observées sont différentes. En effet en milieu TSB-YE une diminution relativement importante de la valeur du pH est observée, alors que dans le milieu modèle, cette diminution est moindre exceptée dans le cas de *S. putrefaciens* où une augmentation survient au cours de l'incubation. Cette variation des valeurs de pH dans le cas du milieu modèle est le résultat du métabolisme bactérien et de l'augmentation qui résulte de l'altération de la chair du poisson contenue dans le milieu modèle par les différentes souches. En effet par les phénomènes de glycolyse, lipolyse, protéolyse et la dégradation du TMAO, beaucoup de composés aminés vont être libérés ce qui induit une augmentation de la valeur du pH (Tarr, 1939 ; Soudan *et al.*, 1965 ; Hobbs et Hodgkiss, 1982). Ces derniers phénomènes sont beaucoup plus importants dans le cas de *S. putrefaciens* qui est la seule des quatre souches impliquée dans le mécanisme de putréfaction du poisson.

### ***Résumé***

**La présence d'une matrice complexe, le milieu modèle, interfère dans le fonctionnement chimique du LP-s optimisé. Les valeurs de pH obtenues sont plus faibles mais ceci s'explique par le fait que le milieu modèle n'est pas tamponné. La peroxydation du SCN<sup>-</sup> est plus lente au cours de l'incubation.**

**Une comparaison du comportement culturel des différentes souches sur le milieu TSB-YE et sur le milieu modèle permet de vérifier que les quatre souches de l'étude cultivent aussi bien sur les deux milieux.**

**Il est alors possible de tester l'efficacité du LP-s sur les souches en milieu modèle.**

### III.2.5. Impact du LP-s optimisé sur la croissance des souches à 4 °C

Les analyses ont été réalisées en double ce qui ne permet pas une analyse statistique fiable. Seule une moyenne arithmétique a été calculée. Ces analyses ont été effectuées à 4 °C en milieu modèle pendant 296 h, avec ou sans le LP-s optimisé, en présence d'une souche ou de toutes les souches.

Un dosage du glucose à la fois répétable et reproductible n'a pu être mis en place dans le milieu modèle ; de ce fait les résultats de la consommation du glucose ne seront pas exploités. De même, la mesure de l'indice de peroxyde dans le milieu modèle en présence de souches et du LP-s n'a pas donné de résultats reproductibles. La concentration d'oxygène dissous dans le milieu modèle n'est plus détectable dès la première prise d'essai qui a lieu après 12 h d'incubation.

De même que lorsque les expériences ont été réalisées en milieu TSB-YE, l'évolution de la peroxydation du thiocyanate en absence de souche est statistiquement identique à celle observée en présence d'une ou de plusieurs souches, quelle que soit la souche considérée.

#### ***Listeria monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>**

❖ La croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est fortement affectée en milieu modèle par la présence du LP-s (Figure 45). La bactériostase est de 120 h d'incubation et la reprise de croissance est très modérée. La population atteinte en présence de LP-s en fin d'incubation (296 h) est de  $3,2 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup> alors que celle du témoin atteint une population finale de  $7,6 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>.

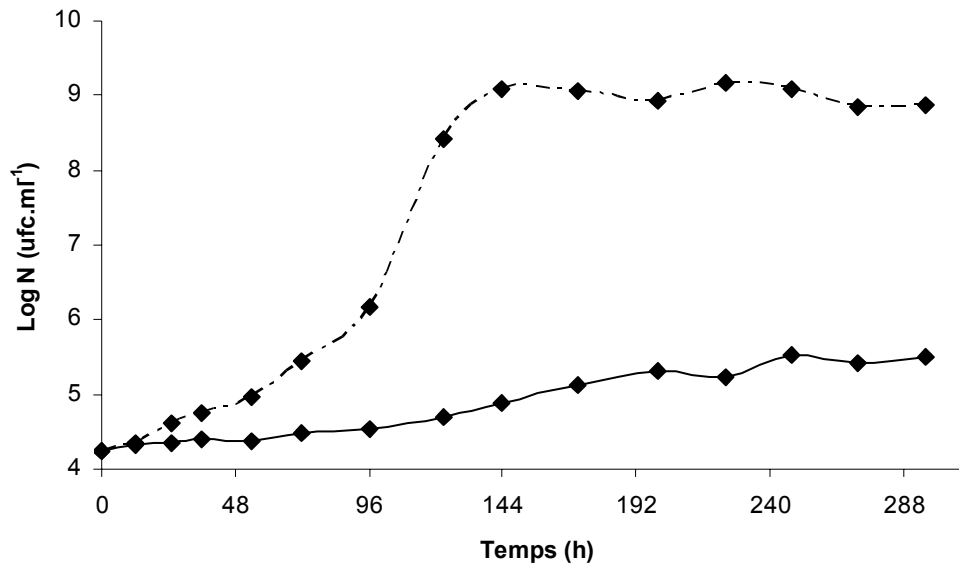


Figure 45 : Croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> à 4 °C, en milieu modèle, en absence (-----) ou en présence de LP-s (—)

❖ La variation de pH observée en présence de LP-s reflète essentiellement l'acidification du milieu par l'acide gluconique car la souche n'a que très faiblement poussé (Figure 46). Cette diminution peut aussi être due à la production de composés faiblement acidifiants issus de décarboxylations et d'oxydations suite à la consommation des composés de la chair du poisson par la bactérie.

En absence de LP-s, la valeur de pH diminue de 6,71 à 6,12 en 96 h et puis remonte ensuite jusqu'à une valeur de 6,62 en fin d'incubation. La bactérie réalise principalement dans la chair du poisson des réactions de glycolyse et de protéolyse, ce qui implique une production de composés acidifiants, et expliquerait cette diminution des valeurs de pH avant la phase exponentielle de croissance. Les réactions d'altération vont libérer des composés aminés en grande concentration. Ceci est corroboré par l'augmentation de la valeur du pH en phase exponentielle de croissance.

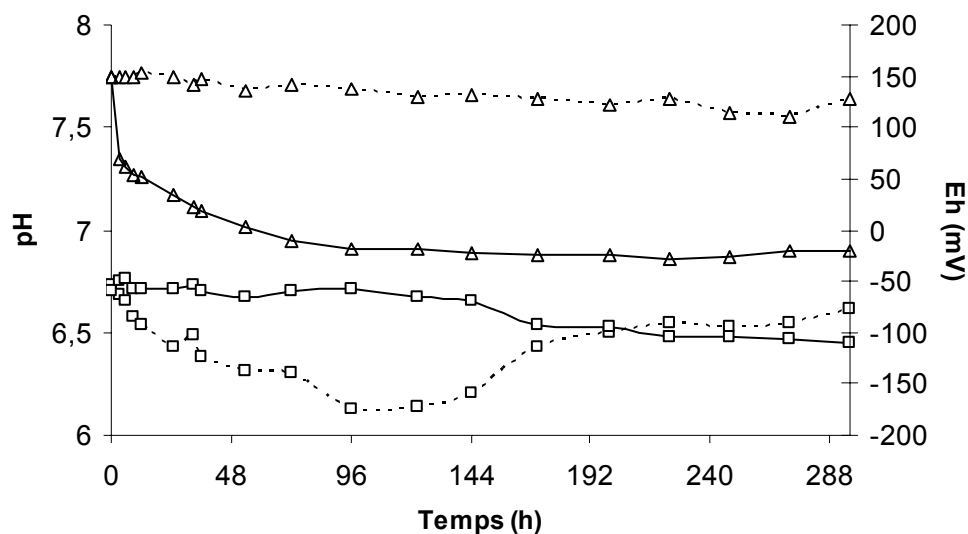


Figure 46 : Evolution des valeurs du pH (□) et du potentiel d'oxydo-réduction (Δ) en présence de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, en absence (.....) ou en présence de LP-s (—)

❖ En absence de LP-s, la variation du potentiel d'oxydo-réduction (Eh) n'est pas très marquée, de + 150 à + 128 mV (Figure 46). En présence du LP-s, cette variation est importante ; elle chute de + 150 à – 20 mV. Cette variation est très importante au cours des 50 premières heures puis se stabilise ensuite entre des valeurs de – 10 à – 30 mV. Ceci correspond à la production massive d'OSCN<sup>-</sup> et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais la production d'OSCN<sup>-</sup> est à peu près constante pendant les 150 premières d'incubation ce qui signifie qu'après 50 h d'incubation à 4 °C, il y a autant de composés produits que de composés utilisés.

#### ***Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>**

❖ En milieu modèle, à 4 °C et pendant 296 h d'incubation, la population en *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> varie de  $3,5 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup> à  $3,6 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Un écart de 3,6 unités log<sub>10</sub> entre la population de l'essai et la population témoin est mesuré pendant 120 h d'incubation (Figure 47).



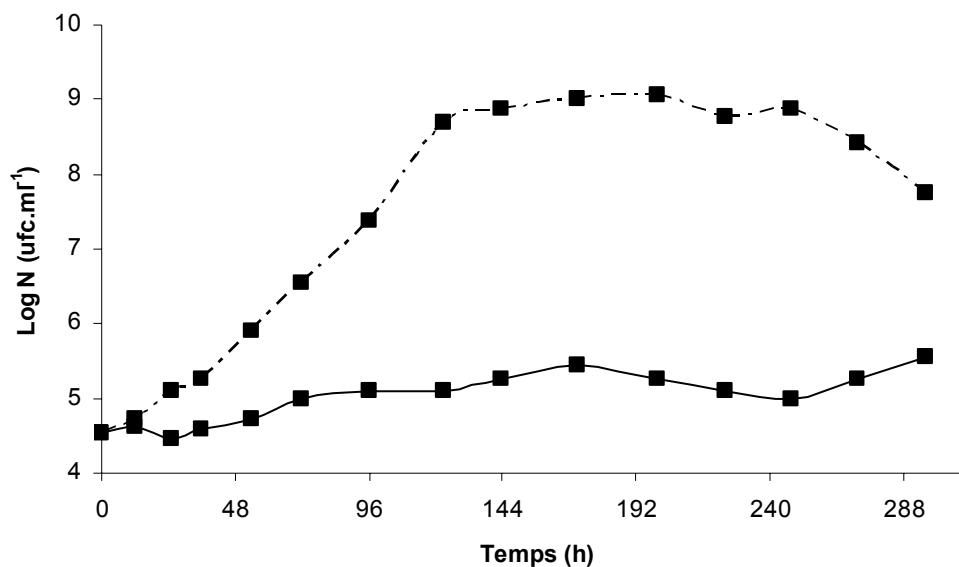


Figure 47 : Croissance de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> à 4 °C en milieu modèle en absence (.....) ou en présence de LP-s (—)

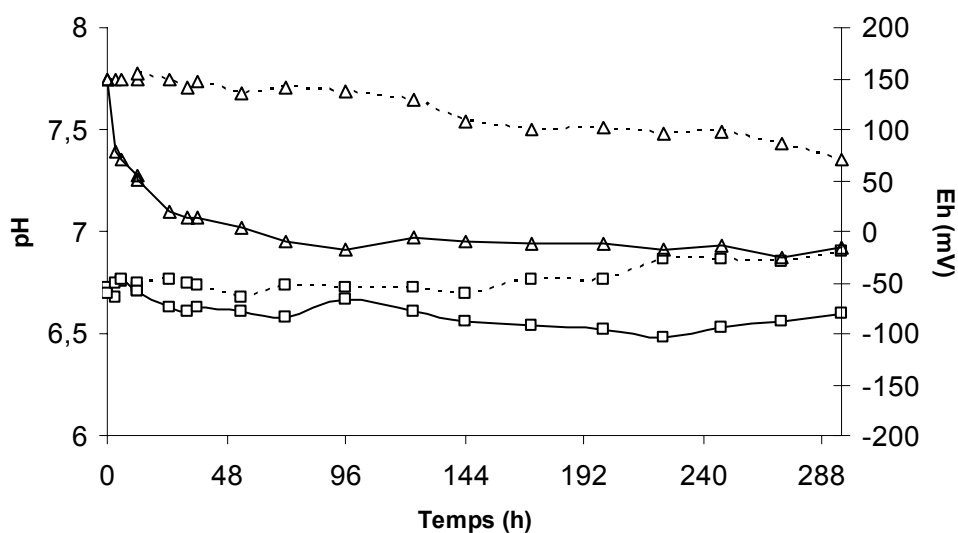


Figure 48 : Evolution des valeurs du pH (□) et du potentiel d'oxydo-réduction (Δ) en présence de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, en absence (.....) ou en présence de LP-s (—)

❖ En milieu modèle en absence de LP-s, une faible augmentation du pH est observée, de 6,7 à 6,9 (Figure 48). Cet écart est dû à la production de composés aminés qui survient suite à la dégradation de la chair du poisson. En présence de LP-s, une faible diminution de 0,1 unité de pH est observée après 296 h d'incubation.

❖ En absence de LP-s, les valeurs du Eh varient de + 150 mV à + 70 mV. La décomposition de certains composés comme le TMAO dont est capable *B. thermosphacta* est responsable de cette variation de Eh. En présence de LP-s, l'Eh chute de + 150 mV à – 20 mV. La production de composés chargés négativement par le LP-s est la cause de cette brusque diminution au cours des 50 premières heures d'inhibition.

### *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>

❖ Le comportement de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> en milieu modèle est sensiblement identique aux comportements des autres souches Gram-positives de cette étude (Figure 49). La croissance est très fortement ralentie au cours de toute l'incubation, la population évolue de  $3,4 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup> à  $7,9 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Un écart maximum de niveaux de population de 3,5 log<sub>10</sub> est observé entre les essais et les témoins à 170 h d'incubation.

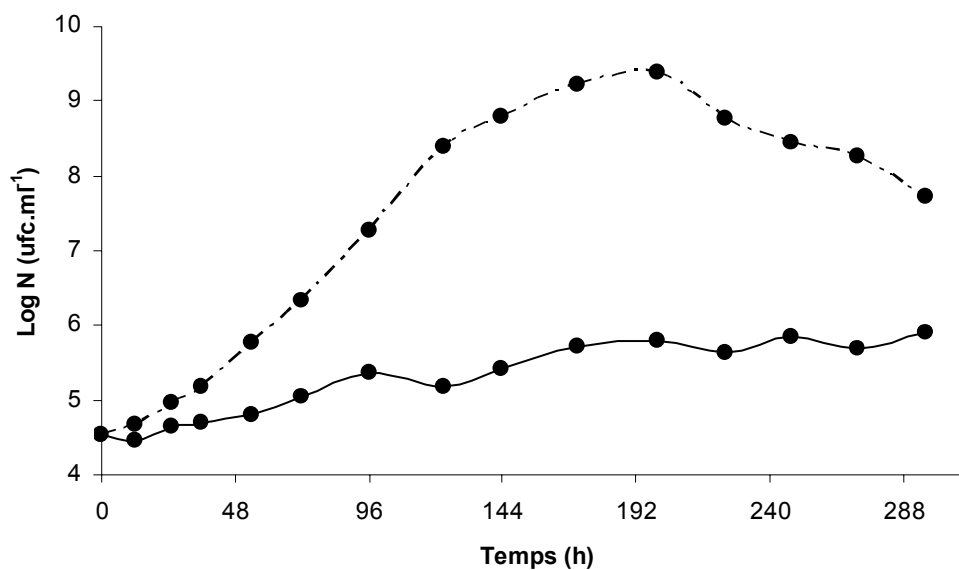


Figure 49 : Croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> à 4 °C en milieu modèle en absence (.....) ou en présence de LP-s (—)

❖ En absence de LP-s en milieu modèle, la valeur du pH de 6,7 à 6,3 (Figure 50). Cette différence est liée à la composition complexe de la chair du poisson et donc une somme de produits métabolisés faiblement acidifiants. Cette acidification n'est que 0,2 unités de pH en présence du LP-s ; elle est essentiellement due à la production d'acide gluconique par le système.

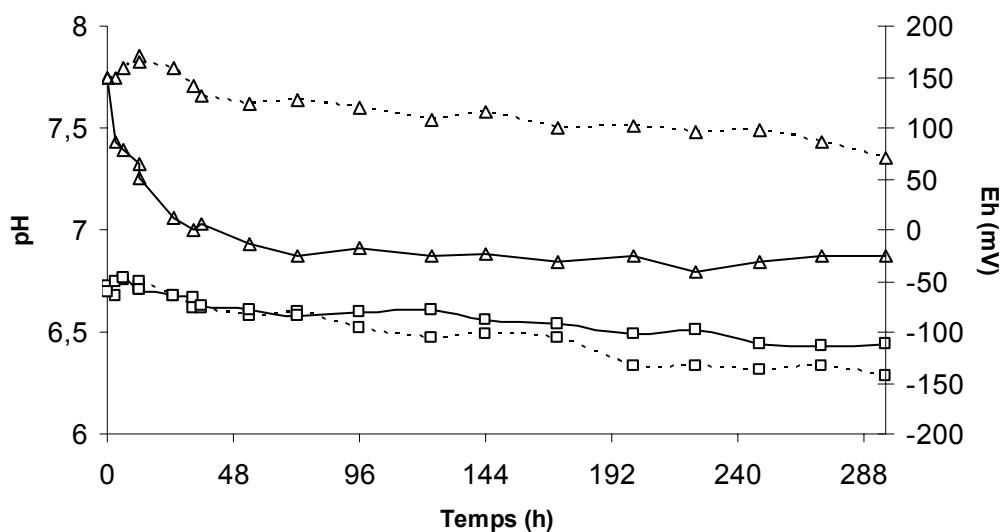


Figure 50 : Evolution des valeurs du pH (□) et du potentiel d'oxydo-réduction (Δ), en présence de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, en absence (.....) ou en présence de LP-s (—)

❖ L'évolution du Eh en absence de LP-s est similaire à celle observée en présence de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, avec une diminution de +150 à +70 mV et un faible pic à 164 mV après 12 h d'incubation.

En présence de LP-s et de la souche, les variations de pH et de Eh font l'objet des mêmes observations et conclusions que dans les analyses mettant en jeu *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>.

### *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>

❖ L'effet du LP-s sur la croissance de *S. putrefaciens* CIP 8040<sup>T</sup> en milieu modèle entraîne une bactériostase prolongée jusqu'à 123 h d'incubation suivie d'une faible reprise de croissance (Figure 51). La population finale est de  $7,6 \cdot 10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup>, avec un écart maximum de 3,6 log<sub>10</sub> après 72 h d'incubation.

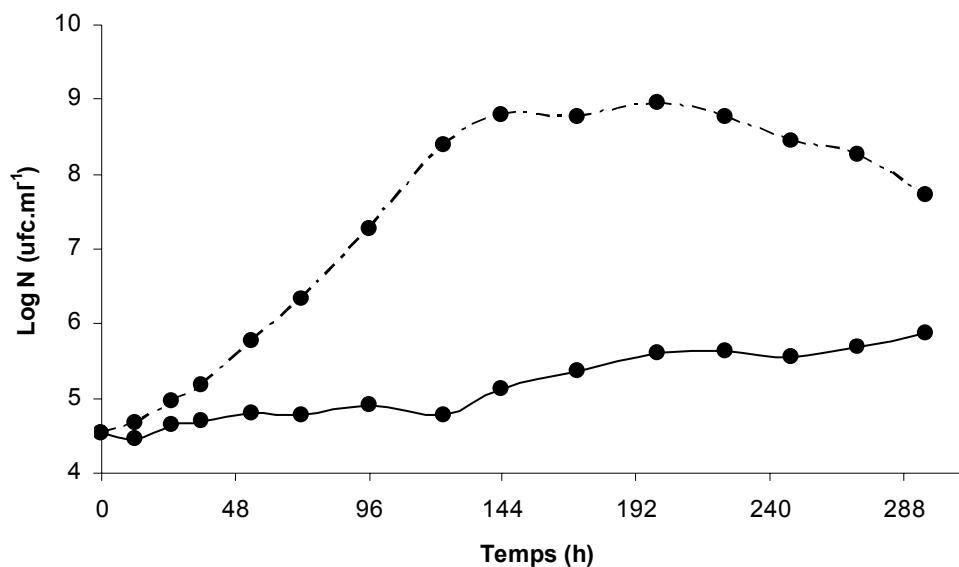


Figure 51 : Croissance de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> à 4 °C en milieu modèle en absence (.....) ou en présence (—) de LP-s

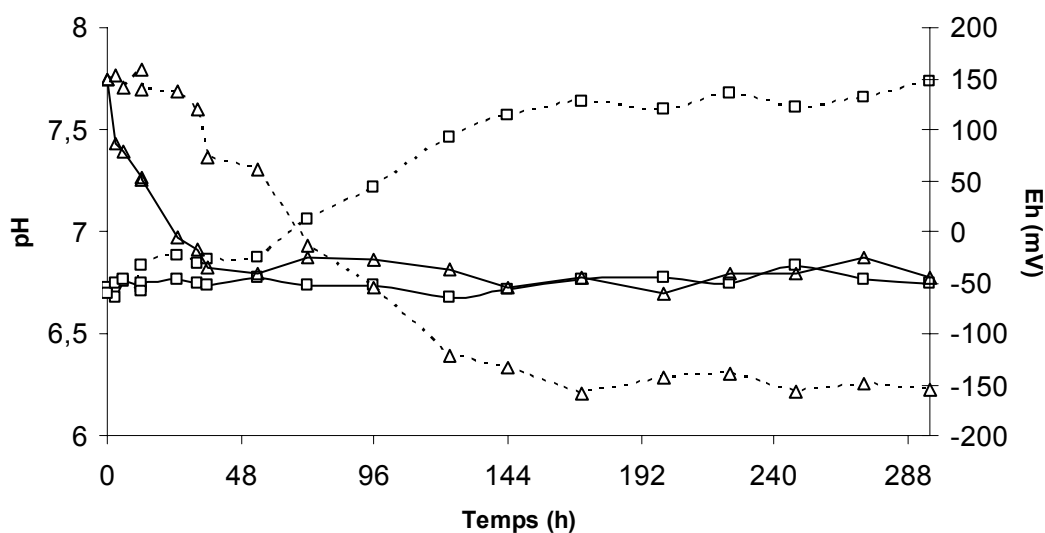


Figure 52 : Evolution des valeurs du pH (□) et du potentiel d'oxydo-réduction (Δ), de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>, en absence (.....) ou en présence de LP-s (—)

❖ *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est une des souches majoritairement responsable du phénomène de putréfaction, de la dégradation du TMAO et de la production d'amines biogènes. En culture pure en absence de LP-s, la valeur du pH subit une constante augmentation, de 6,7 à 7,7 (Figure 52).

❖ La production des composés préalablement cités sont à l'origine de cette augmentation et de la chute du Eh (de + 150 à - 155 mV).

En présence du LP-s et de la souche, les variations des valeurs de pH et de Eh sont sensiblement identiques aux trois premières analyses, excepté que la valeur du Eh est plus faible, - 46 mV, du fait de la faible pousse de la souche.

### Résumé

Le LP-s optimisé a un effet antibactérien plus important en milieu modèle qu'en milieu TSB-YE. Le fonctionnement du système est ralenti. La croissance de chacune des souches est très fortement ralentie dans le milieu modèle. L'inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> engendre un écart maximal de 4,2 unités log<sub>10</sub> à 144 h d'incubation. Pour cette souche, en milieu TSB-YE, cet écart était obtenu dans les conditions de culture mixte. L'activité anti-*Listeria* du LP-s est donc renforcée. Le LP-s est plus efficace en milieu modèle qu'en milieu TSB-YE sur la croissance de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, la bactériostase était de 96 h et la population finale était similaire à celle du témoin. Contrairement à *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, l'effet du LP-s en milieu modèle et celui observé en milieu TSB-YE sur la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> sont similaires excepté la phase de latence uniquement dans le cas du milieu modèle.

| Paramètres en présence du LP-s                             | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i> DSM<br>20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i><br>CIP 80.40 <sup>T</sup> |
|--|---|---|--|--|
| Durée de la bactériostase (h)                              | 120   | 296   | 70   | 123  |
| Retard maximum de la croissance (unité log <sub>10</sub> ) | 4,2   | 3,6   | 3,6  | 3,7  |
| Population finale (ufc.ml <sup>-1</sup> )                  | 3,2.10 <sup>5</sup>                               | 3,6.10 <sup>5</sup>                               | 7,9.10 <sup>5</sup>                                | 7,6.10 <sup>5</sup>                              |
| pH (sans/avec LP-s)  | 6,62/6,45   | 6,9/6,59  | 6,23/6,45  | 7,73/7,74  |
| Eh (sans/avec LP-s)  | +130/-20  | +70/-15,5   | +70/-26  | -155/-46   |

*S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> est la souche qui modifie le plus les caractéristiques physico-chimiques du milieu car c'est celle qui est la plus impliquée dans les différentes modifications de la chair du poisson au cours de l'altération. La bactériostase est de même durée en milieu TSB-YE ou en milieu modèle, avec cependant une population finale inférieure par rapport au témoin en milieu modèle alors qu'en milieu TSB-YE elles sont identiques.

La date limite de conservation du poisson à l'état frais réfrigéré est de deux jours au froid. D'après les résultats obtenus, l'utilisation du LP-s permettrait de rallonger le temps de conservation au froid de 22 h si la référence est le temps de bactériostase.

#### Etude de la croissance des souches en culture mixte

❖ En milieu modèle à 4 °C, des bactéricidies sont observées (Figure 53). En effet *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>, après une bactériostase de 72 h, voient leur population chuter jusqu'à ce qu'elles ne soient plus détectables après respectivement 200 h et 120 h d'incubation à 4 °C. La population en *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> est stable pendant 144 h d'incubation puis diminue considérablement jusqu'à atteindre un niveau de  $4,5 \cdot 10^0$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Seul *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, survit à l'action du LP-s et maintient sa population jusqu'à la fin de l'incubation ( $7,9 \cdot 10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>).

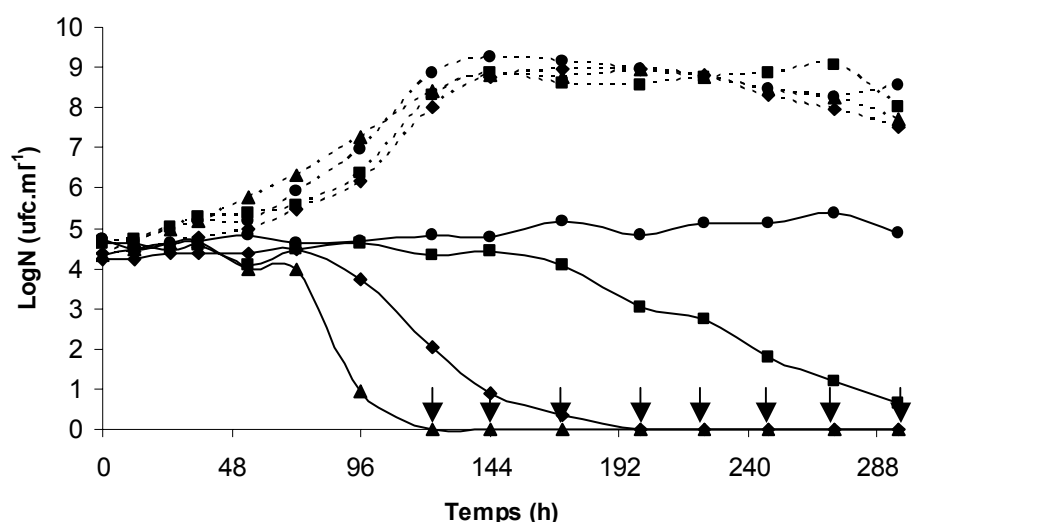


Figure 53 : Croissance en culture mixte de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> (◆), *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> (■), *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> (●), *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> (▲) à 4 °C en milieu modèle en absence (.....) ou en présence de LP-s (—)  
▼, niveau de population inférieur à 1 ufc.ml<sup>-1</sup>.

❖ En absence de LP-s, le pH et l'Eh sont très fortement modifiés (Figure 54). Ces variations, de 6,7 à 7,9 pour les valeurs de pH et de + 150 à - 184 mV pour les valeurs de Eh, sont le cumul des variations dues à chacune des souches et donc essentiellement à *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> par toutes les réactions d'altération dont elle est à l'origine.

En présence de LP-s et des quatre souches, les valeurs de pH ne varient pas de manière significative, de 6,7 à 6,6. En revanche, la valeur finale du Eh est plus faible que lors des analyses en cultures pures (- 82 au lieu de environ - 20 mV).

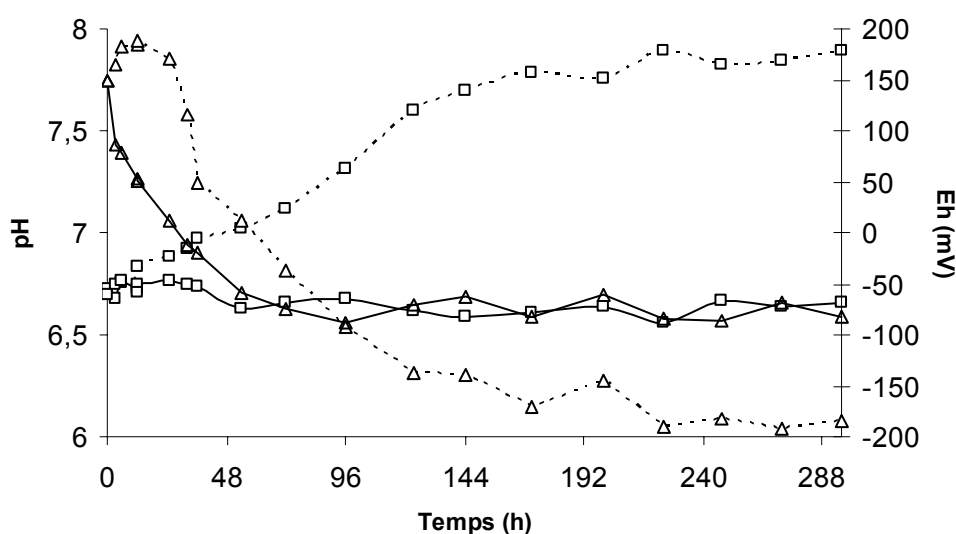


Figure 54 : Evolution des valeurs du pH (□) et du potentiel d'oxydo-réduction (Δ) en absence (.....) ou en présence (—) de LP-s, et de la culture mixte de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>, à 4 °C en milieu modèle

### Résumé

Lorsque les souches sont cultivées en culture mixte dans le milieu modèle et en présence de LP-s, une bactéricidie est visible. En moins de 200 h d'incubation à 4 °C, les populations de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> et de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> sont indétectables. *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> est plus résistante que les deux souches précédentes, car la lyse cellulaire, observée par un déclin du niveau de population, n'apparaît qu'après 144 h d'incubation et n'est pas totale après 296 h d'incubation. *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> maintient sa population au niveau d'ensemencement jusqu'à la fin de la durée d'incubation.

| Paramètres en présence du LP-s                             | <i>L. monocytogenes</i><br>DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i><br>DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i><br>DSM 20700 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i><br>CIP 80.40 <sup>T</sup> |
|--|---|---|--|--|
| Durée de la bactériostase (h)                              | 72  | 144   | 296  | 72   |
| Retard maximum de la croissance (unité log <sub>10</sub> ) | 8,8   | 7,9   | 3,9  | 8,4  |
| Population finale (ufc.ml <sup>-1</sup> )                  | < 1   | 4,5.10 <sup>0</sup>                               | 7,9.10 <sup>4</sup>                                | <1   |
| pH (sans/avec LP-s)  | 7,89/6,66   |   |  |  |
| Eh (sans/avec LP-s)  | - 184/- 82  |   |  |  |

En culture mixte, en milieu TSB-YE et en présence de LP-s, aucune bactéricidie n'a été observée. Dans ces conditions, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> présentait la bactériostase la plus longue avec le niveau de population finale le plus bas. En milieu modèle, cette plus grande sensibilité de cette souche se retrouve car c'est la première souche dont la population devient indétectable. En milieu modèle, en culture mixte et en présence de LP-s, *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> se révèlent être plus sensibles au système antibactérien que *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup>, comportement inversé comparativement aux croissances bactériennes observées en culture mixte en milieu TSB-YE.

D'après la note DGAL/SDHA/N2001-8090 du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche datée du 27 juin 2001 qui détaille les critères microbiologiques applicables aux aliments, la population aérobie des filets de poissons frais réfrigérés ne doit pas excéder 10<sup>5</sup> ufc.g<sup>-1</sup>. Dans ces conditions, la date limite de conservation à l'état frais réfrigéré pourrait être allongée de 250 h soit environ 10 jours.

### III.2.6. Impact du LP-s et du comportement des souches sur la composition lipidique

L'analyse des acides gras par leurs identifications et la détermination de leurs concentrations ont été effectuées sur chacun des essais, en début et en fin d'études (296 h), et réalisée en double (Tableau 24).



| Nature des acides gras | Nom courant (acide)               | Poisson dilué au 1/4 | <i>L. monocytogenes</i> DSM 20600 <sup>T</sup> | <i>B. thermosphacta</i> DSM 20171 <sup>T</sup> | <i>C. maltaromaticum</i> DSM 20730 <sup>T</sup> | <i>S. putrefaciens</i> CIP 80.40 <sup>T</sup> | Les quatre souches | Les quatre souches + LP-s | LP-s seul ou avec chacune souche |
|------------------------|-----------------------------------|----------------------|--|--|---|---|--------------------|---------------------------|----------------------------------|
| C14                    | Myristique                        | 3,89                 | 4,16   | 4,22   | 4,88  | 5,46  | 4,19               | 3,97                      | 4,05                             |
| C14:1Δ9                | Myristoloéique                    | 0,12                 | 0,14   | 0,12   | <u>1,10</u>                                     | 0,26  | <u>0</u>           | 0,29                      | 0,11                             |
| C15:1                  | Cis-10-pentadécénoïque            | 0,30                 | 0,30   | 0,32   | 0,39  | 0,39  | 0,32               | 0,33                      | 0,29                             |
| C16                    | palmitique                        | 14,60                | 14,79  | 15,00  | 16,84   | 18,69   | 15,81              | 14,68                     | 14,60                            |
| C16:1Δ9                | Palmitoléique                     | 5,76                 | <u>3,52</u>                                    | <u>6,46</u>                                    | <u>6,39</u>                                     | <u>7,47</u>                                   | <u>6,74</u>        | 6,18                      | 6,03                             |
| C17                    | Margarique                        | 0,67                 | 0,54   | 0,57   | 0,55  | 0,67  | 0,57               | 0,53                      | 0,55                             |
| C18                    | Stéarique                         | 29,76                | <u>0,38</u>                                    | <u>0,42</u>                                    | <u>0,56</u>                                     | <u>0,50</u>                                   | <u>0,45</u>        | <u>0,43</u>               | <u>3,95</u>                      |
| C18:1Δ9                | Oléique                           | 0,11                 | <u>24,41</u>                                   | <u>23,38</u>                                   | <u>24,17</u>                                    | <u>29,92</u>                                  | <u>15,65</u>       | <u>19,16</u>              | <u>22,38</u>                     |
| C18:1Δ7                | Cis-7-octadécénoïque              | <b>0</b>             | 0,12   | <u>1,69</u>                                    | 0,13  | 0,18  | <u>10,15</u>       | <u>5,06</u>               | <u>1,68</u>                      |
| C18:2Δ9,12             | linoléique                        | 7,29                 | 6,18   | 6,45   | 5,92  | 7,47  | 6,48               | 6,31                      | 6,18                             |
| C18:4Δ7,9,12,15        | 7,9,12,15-octadécatétranoïque     | 2,69                 | 2,20   | 2,39   | 2,08  | 2,38  | 2,40               | 2,05                      | 2,03                             |
| C20:1Δ11               | Cis-11-eicosénoïque               | 4,21                 | 3,16   | 4,27   | 3,95  | 5,24  | 3,77               | 4,17                      | 4,12                             |
| C20:5Δ5,8,11,14,17     | 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque   | <b>0</b>             | 0,39   | <u>2,88</u>                                    | <u>2,61</u>                                     | <u>3,88</u>                                   | <u>1,76</u>        | <u>2,85</u>               | <u>2,81</u>                      |
| C22:1Δ11               | Cis-11-docosénoïque               | 6,40                 | 6,85   | 6,85   | 5,93  | 6,69  | 6,49               | 6,97                      | 6,89                             |
| C22:4Δ7,10,13,16       | 7,10,13,16-docosatétranoïque      | <b>0</b>             | <b>0</b>                                       | <u>0,51</u>                                    | <b>0</b>  | <b>0</b>                                      | <b>0</b>           | <b>0</b>                  | <b>0</b>                         |
| C22:5Δ8,11,14,17,19    | 8,11,14,17,19-docosapentaénoïque  | 13,15                | <u>7,69</u>                                    | <u>3,05</u>                                    | <b>0</b>  | <b>0</b>                                      | <b>0</b>           | <b>0</b>                  | <b>0</b>                         |
| C22:6Δ5,8,11,14,17,19  | 5,8,11,14,17,19-docosahexaénoïque | <b>0</b>             | <u>6,27</u>                                    | <u>13,51</u>                                   | <u>11,72</u>                                    | <b>0</b>                                      | <u>12,24</u>       | <u>5,25</u>               | <u>14,04</u>                     |
| total                  |                                   | 89,70                | 81,10  | 92,09  | 87,22   | 89,20   | 87,02              | 78,23                     | 89,71                            |

Tableau 24 : Composition en acides gras du milieu modèle dans les différentes analyses réalisées à 4 °C en absence et en présence de LP-s et avec une ou toutes les souches

La totalité des acides gras mentionnés ne représentent pas 100 % de l'échantillon car tous les pics non identifiables ont été retirés.

L'acide stéarique est présent à environ 30 % en début de culture puis cette teneur devient inférieure à 1 % lors de l'incubation dans toutes les conditions expérimentales testées excepté

lorsque le LP-s est testé seul ou en présence d'une des souches tests quelle que soit cette dernière (environ 4 %). A l'inverse, les acides oléique et Cis-7-octadécénoïque, présents en faible concentration ou absents à  $t_0$ , sont présents, au même niveau que l'était l'acide stéarique. Les acides 5,8,11,14,17-éicosapentaénoïques (C20) et 5,8,11,14,17,19-docosahexaénoïques (C22) n'apparaissent que lorsque toutes les analyses se sont déroulées excepté lors de la culture de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> pour ce dernier. Seule la croissance de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, permet de détecter l'acide 7,10,13,16-docosatétranoïque. L'acide 8,11,14,17,19-docosapentaénoïque (C22) est présent dans le milieu modèle ; il est très peu modifié par les croissances de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> et par celle de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, mais il est non détectable en fin d'incubation dans les autres conditions expérimentales.

Lorsque les quatre souches sont cultivées en culture mixte sans LP-s, l'acide myristoloïque (C14) disparaît totalement en fin d'incubation. Il n'est pas possible d'identifier la souche responsable de cette hydrolyse car aucune des souches cultivées en culture pure ne permet une hydrolyse totale de cet acide gras.

L'impact du LP-s seul sur la qualité lipidique de la chair du poisson n'est pas visible par l'analyse des acides gras. Cet impact est soit nul, ce qui paraît peu probable du fait de la forte réactivité de l' $H_2O_2$  qui est produit par le système, soit pas assez important afin de pouvoir détecter une diminution de la qualité de la chair.

La composition en acides gras du milieu modèle est modifiée par la présence d'une ou de toutes les souches, et/ou par la présence du LP-s optimisé. Ces phénomènes sont dus à la lipolyse, à l'oxydation des chaînes et aux phénomènes de décarboxylations et de déshydrogénation.

---

## Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail était de caractériser un bio-conservateur, le système lactoperoxydasique, de façon à obtenir un effet antibactérien optimal et de valider par la suite son efficacité dans un milieu de laboratoire et dans un modèle alimentaire.

L'utilisation de plans d'expériences a permis d'analyser les interactions entre les différents composants du LP-s, leur impact sur la peroxydation du  $\text{SCN}^-$ , et une optimisation de leurs concentrations. La LPO et le glucose sont les facteurs qui ont l'impact le plus important sur la peroxydation du  $\text{SCN}^-$ . La GOD seule n'a pas de réel impact sur la peroxydation ; en revanche, toutes les interactions avec la GOD influencent très significativement la réponse car cette enzyme subit de fortes inhibitions par ses propres produits et essentiellement par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui est un élément clé du bon fonctionnement du LP-s.

L'une des originalités de ce travail réside dans l'optimisation des concentrations des composants du LP-s. En effet, les données bibliographiques sur les conditions mises en œuvre ne permettent peu ou pas le choix des différentes concentrations. Grâce à l'analyse des courbes d'isoréponses, des équations polynomiales et des chemins optimaux, les conditions à réaliser pour optimiser le fonctionnement du LP-s ont été définies. L'emploi de  $85,5 \text{ UI.l}^{-1}$  de GOD, de  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose et de  $3930 \text{ UI.l}^{-1}$  de LPO, avec une valeur initiale de pH initial de 6,5, permet de peroxyder une plus grande concentration de thiocyanate.

L'impact de la teneur en oxygène sur le fonctionnement du LP-s n'a jamais été étudié, or il est un des premiers substrats du système complet. Des expériences réalisées en réacteur ont permis de vérifier que lorsque l'oxygène n'est pas présent, le système ne fonctionne pas. L'apport optimal d'oxygène est de 10 % et une agitation de la suspension favorise la proximité des différents constituants du système lactoperoxydasique et par conséquent, la peroxydation n'en est que plus rapide. Ces résultats pourraient être exploités dans le cadre d'emballage à atmosphère modifiée afin de limiter la prolifération des différentes souches pathogènes et d'altération. Dans cette perspective, la teneur en oxygène doit être modulée afin de permettre un bon fonctionnement du LP-s sans pour autant favoriser la croissance des flores aérobies et micro-aérophiles.

Lors du fonctionnement du LP-s, la faible acidification du milieu est due à la production d'acide gluconique. L'optimisation de la concentration en glucose ( $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ ) est correcte car lorsque l'on augmente cette concentration (jusqu'à  $4 \text{ g.l}^{-1}$ ), le thiocyanate n'est pas plus rapidement peroxydé. La peroxydation du thiocyanate est maximale dans les 36 premières heures d'incubation (environ  $40 \text{ mg.l}^{-1}$ ) et est totale au cours des 72 premières heures d'incubation. Par ailleurs il faut préciser la présence d'une concentration résiduelle d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu, car après l'arrêt de sa production, cette concentration est suffisante pour peroxyder le  $\text{SCN}^-$  encore présent dans le milieu. Au cours de toutes les analyses réalisées dans cette étude, aucune réduction de l' $\text{OSCN}^-$  en  $\text{SCN}^-$  n'a été décelée contrairement à ce qui avait été suggéré par Reiter et Härnolv (1984), de Witt et van Hooydonk (1996) et O'Brien (2000).

Une étude comparative entre les effets du LP-s optimisé et du LP-s utilisé par Boussouel *et al.* (2000) a prouvé la nécessité de l'optimisation. *L. monocytogenes* et *P. fluorescens* ont été utilisés comme souches tests. Dans les deux cas, l'effet antibactérien est plus important. La croissance de *L. monocytogenes* est retardée de 24 h supplémentaires passant de 48 à 72 h. La croissance de *P. fluorescens* est totalement inhibée, alors que l'effet sur cette souche n'était que bactériostatique avec l'ancien système.

Les valeurs des concentrations des différents composants du système optimisé sont comparables à celles d'autres systèmes. Cependant, la concentration de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  retenue en  $\text{SCN}^-$ , volontairement en excès, est supérieure aux  $30 \text{ mg.l}^{-1}$  relevés dans la nature (Reiter et Härnolv, 1984 ; Kussendrager, 1994) ; elle est néanmoins plus faible que les concentrations observées dans la littérature qui peuvent atteindre des valeurs dix fois supérieures (Dionysius *et al.*, 1992 ; Bosch *et al.*, 2000 ; McLay *et al.*, 2002). Comme l'ont montré les CMI et les différentes analyses, l'effet du LP-s optimisé est souche - et température - dépendant. Cette concentration en  $\text{SCN}^-$  peut donc être diminuée. Par exemple, dans le cas de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , les concentrations des différents constituants du système peuvent être divisées au  $1/16$ , mais seulement d'un facteur  $1/2$  à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Lors de la détermination des CMI, les tests réalisés avec de l' $\text{OSCN}^-$  ont permis de mettre en évidence une meilleure activité antibactérienne de ce composé, en comparaison avec le LP-s optimisé. Dans une perspective proche, des études en réacteur avec un système optimisé dont le  $\text{SCN}^-$  aura été consommé, permettant ainsi un apport initial d' $\text{OSCN}^-$ , pourraient être mises en œuvre. Cette technique, moins complexe que l'apport de tous les composants du LP-s à

chaque manipulation, diminuerait le coup final de l'utilisation du LP-s car les enzymes ne seraient pas renouvelées, leurs activités spécifiques étant stables pendant six mois à 4 °C. La concentration en glucose du LP-s optimisé est de 1,5 g.l<sup>-1</sup>. Les différentes études ont montré une capacité des souches à pousser dans les différents milieux en absence ou en présence de cette source d'énergie. Un apport important de glucose, soit 4 g.l<sup>-1</sup> (correspondant à 1,5 g.l<sup>-1</sup> contenu dans le LP-s optimisé et à 2,5 g.l<sup>-1</sup> issu du milieu TSB-YE commercial), n'a pas d'influence sur le comportement cultural des souches, mais un arrêt de la consommation du glucose par le LP-s est observé après 48 h d'incubation à 4 °C. Cet arrêt correspond à un manque d'oxygène dissous dans le milieu, et peut être également une intoxication de la GOD par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Trois problématiques étaient posées par un apport de glucose dans une matrice alimentaire : celle de "sucre" un aliment, celle de favoriser la croissance bactérienne avec un impact négatif sur la conservation et celle par rapport à un phénomène de compétition pour la consommation de ce substrat entre le LP-s et les souches. La concentration de glucose amené par l'ajout de LP-s est totalement consommée dans les 36 premières heures d'incubation, la matrice alimentaire n'est donc "sucrée" que très temporairement. Au cours de nos analyses, le glucose favorise l'action du LP-s ce qui se traduit par une baisse du niveau des populations. La compétition pour la consommation de ce substrat est en faveur du LP-s mais n'est pas défavorable aux croissances des souches car elles cultivent très bien en absence de glucose.

Les valeurs de pKa dans les différentes conditions révèlent une toxicité plus importante, pour les souches, de l'acide gluconique (pKa de 3,27) par rapport à l'acide lactique (pKa de 3,83). Un suivi de la concentration de ces deux acides au cours des différentes analyses permettrait de quantifier leur rôle dans les différentes acidifications. Des cinétiques de la croissance en présence de ces deux acides pourraient permettre de comprendre l'impact de chacun d'entre eux sur la croissance des différentes souches.

Deux milieux de culture ont été utilisés pour évaluer l'effet inhibiteur du LP-s sur les quatre souches, le milieu de laboratoire TSB-YE et le milieu modèle créé pour cette étude. Ce milieu modèle est réalisé à partir de truites arc-en-ciel issues d'aquaculture continentale. Des numérations ont permis de vérifier que les souches cultivaient de façon similaire sur les deux milieux à 4 °C et à leur température optimale de croissance. La composition complexe du milieu modèle ne défavorise pas la croissance des souches. Ce milieu modèle, composé de filets de poissons broyés, a été mis au point et utilisé afin de permettre une meilleure homogénéisation des composants du LP-s et des souches, de meilleures homogénéités et

reproductibilités des prélèvements et des dosages et une maîtrise des flores contaminantes ajoutées.

Des analyses de croissances bactériennes en cultures pures et en cultures mixtes ont été réalisées dans les deux milieux. Le suivi, en présence de LP-s, de la croissance de souches bactériennes en cultures mixtes et la comparaison avec des croissances réalisées en cultures pures n'a jamais été réalisé dans la littérature.

En culture pure en milieu TSB-YE, la croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est la plus affectée de cette étude. La croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> subit une bactériostase plus courte, 48 h au lieu de 96 h. Les niveaux finaux de population sont de l'ordre de  $10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup> pour ces deux souches, soit de 2 log<sub>10</sub> inférieurs aux populations témoins. Les croissances de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> et *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> subissent des bactériostases assez longues, au-delà de 100 h, mais une croissance ultérieure rapide permet d'atteindre les niveaux de populations des témoins en fin d'incubation.

En culture pure en milieu modèle, un ralentissement plus ou moins important de la croissance est observé pour toutes les souches, avec des écarts de 3,6 à 4,2 log<sub>10</sub> entre les populations des témoins et celles des essais avec LP-s. Ces analyses ont permis de mettre en évidence l'implication de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> dans les phénomènes de l'altération de la chair du poisson par des modifications physico-chimiques du milieu par l'étude des variations de pH et de Eh.

La réalisation d'études de croissance avec des cultures mixtes a permis de mettre en évidence que les souches n'ont pas d'interactions sur leur croissance respective. L'effet inhibiteur du LP-s est plus important en présence des quatre souches en culture mixte, en milieu TSB-YE et en milieu modèle. Dans le milieu modèle à 4 °C, le LP-s a un effet bactéricide vis-à-vis de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> et *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>. La population en *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> stagne au niveau de la population initiale jusqu'à la fin du temps d'incubation. Si un seuil de  $10^5$  ufc.ml<sup>-1</sup> est fixé pour définir l'altération, comme le signale la note DGAL/SDHA/N2001-8090 du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, ce niveau de population est atteint après 72 h d'incubation en présence du LP-s en milieu TSB-YE et n'est jamais atteint en milieu modèle en présence du LP-s, ce qui rallonge la date limite de conservation d'un peu plus de 10 jours. Le ralentissement de la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20730<sup>T</sup> en présence de LP-s a peu d'impact sur la conservation du poisson car c'est une souche faiblement altérante. De plus, des essais pourraient être réalisés avec souches productrices de bactériocines pour bénéficier

de cette croissance modérée afin d'inhiber d'autres souches responsables d'une forte altération du poisson.

La consommation du SCN<sup>-</sup> est plus lente en cultures mixtes en milieu TSB-YE et d'autant plus en milieu modèle, et l'effet antibactérien est plus important. Cette peroxydation plus lente pourrait être due à une moindre disponibilité du SCN<sup>-</sup> et du glucose pour le fonctionnement du LP-s. Une production plus douce d'agent antibactérien aurait à long terme un effet plus élevé sur la croissance ; ceci pourrait traduire un excès d'agent antibactérien et donc de SCN<sup>-</sup>, seul composant dont la concentration avait été fixée et non optimisée. La perspective de l'utilisation, en culture mixte, de réacteur combinant un apport massif d'agent antibactérien suivie de sa production douce permettait peut être d'observer des effets plus importants et/ou plus durables.

Plusieurs travaux ont employé l'utilisation ou la production *in situ* de bactériocines afin d'inhiber la croissance de bactéries non désirables, essentiellement *L. monocytogenes* (Duffes *et al.*, 1999 ; Duffes *et al.*, 1999 ; Katla *et al.*, 2001 ; Pantev *et al.*, 2002 ; Zuckerman et Ben Avraham, 2002 ; Brillet *et al.*, 2004 ; Brillet *et al.*, 2005). Les auteurs ont observé un effet au minimum bactériostatique sur la croissance des souches cibles. Seuls Rodriguez *et al.* (1997), Boussouel *et al.* (1999) et Boussouel *et al.* (2000) ont expérimenté une combinaison entre les bactériocines et le LP-s ce qui leur a permis d'observer un effet bactéricide vis-à-vis de *L. monocytogenes*.

Des études complémentaires seraient nécessaires afin de comparer ces effets antibactériens sur des cubes de filets et/ou des filets de truites frais et entiers car notre milieu modèle stéril est composé de filets de poissons broyés et dilués au quart.

L'apport du système peut être réalisé de différentes manières. Le trempage ou la vaporisation sont possibles mais l'homogénéisation du système n'est pas favorisée ; dans ce cas l'emploi de solution d'OSCN<sup>-</sup> serait plus approprié. L'injection du LP-s dans la chair du poisson présenterait comme inconvénient, en plus d'une répartition non homogène du système dans l'échantillon, celui de la disponibilité de l'oxygène sans lequel le système ne peut fonctionner. Une dernière technique par contact dans un papier imprégné et une conservation en barquette, ce qui rejoint une notion d'emballage actif, a été testée au laboratoire et a présenté des résultats encourageants.

Des études complémentaires pourraient être réalisées en élargissant le panel de souches tests en tenant compte de tous les différents groupes de bactéries responsables de l'altération de la

---

chair du poisson, telles que *Lactobacillus alimentarius*, *Photobacterium phosphoreum* ou *Enterococcus faecalis*, ainsi que vis-à-vis de la flore pathogène, telle que *Flavobacterium psychrophilum* ou *Salmonella* sp.

L'emploi de milieux sélectifs afin de suivre la croissance des différentes souches en cultures mixtes est encore possible avec quatre souches tests. Mais pour des études réalisées avec un nombre de souches plus important, la technique de PCR quantitative permettrait le suivi des différentes croissances bactériennes des différentes souches, en cultures pures et mixtes, dans les différents supports utilisés.

Des études précédentes réalisées au laboratoire ont abouti à l'encapsulation du système ce qui facilite son utilisation car la mise en œuvre d'un système efficace est complexe. L'utilisation du système optimisé sous forme encapsulée sur les produits de la pêche dès la capture permettrait peut être une plus longue conservation de ces derniers ou au moins une diminution des conséquences de la rupture de la chaîne du froid lors des différentes étapes du transports de ces produits. Ceci rejoindrait les travaux conduits en Australie et qui ont permis la validation de l'utilisation de LP-s, par trempage des viandes pour l'importation et l'exportation à moyen terme. La différence entre les systèmes réside dans la mise à disposition du peroxyde d'hydrogène qui est introduit tel quel dans la solution à vaporiser. Etant donné que ce bio-conservateur est aussi accepté par l'AFSSA pour la conservation de certaines salades, il est envisageable d'élargir l'utilisation future de ce bio-conservateur à de nombreuses denrées périssables.



---

## Références bibliographiques

1. Adamson M, Pruitt KM (1981) Lactoperoxidase-catalyzed inactivation of hexokinase. *Biochem Biophys Acta Enzym* 658:238-247.
2. Adolphe Y, Jacquot M, Linder M, Revol-Junelles AM, Millière JB (2006) Optimisation of the combination of the inhibitory potentiality of glucose oxidase and lactoperoxidase systems by Response Surface Methodology approach. *J App Microbiol* 100:1034-1042.
3. Aune TM, Thomas EL (1977) Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur J Biochem* 80:209-214.
4. Barrett NE, Grandison AS, Lewis MJ (1999) Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *J Dairy Res* 66:73-80.
5. Beatty SA, Gibbons NE (1937) The measurement of spoilage in fish. *J Biol Board Can* 3:77-91.
6. Beatty SA, Collins VK (1939) Studies of fish spoilage. IV. The breakdown of carbohydrates, protein and amino acids during spoilage of cold muscle press juice. *J Fish Res Board Can* 4:412.
7. Belding ME, Klebanoff SJ, Ray CG (1970) Peroxidase-mediated virucidal systems. *Sci* 167:195-196.
8. Benoy MJ, Essy AK, Sreekumar B, Haridas M (2000) Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Life Sci* 66:2433-2439.
9. Bergmeyer J (1983) Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H, ed). New York: John Wiley.
10. Betts RH, Dainton FS (1953) Electron transfer and other processes involved in spontaneous bleaching of acidified aqueous solutions of ferric thiocyanate. *J Am Chem Soc* 75:5721-5724.
11. Bhugaloo-Vial P, Grajek W, Dousset X, Boyaval P (1997) Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors. *Enzym Microbial Technol* 21:450-457.
12. Bhugaloo-Vial P, Dousset X, Metivier A, Sorokine O, Anglade P, Boyaval P, Marion D (1996) Purification and amino acid sequences of pisciocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl Environ Microbiol* 62:4410-4416.
13. Bibi W, Bachmann MR (1990) Antibacterial effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on the growth of *Listeria* spp. in skim milk. *Milchwissen* 71:3237-3245.

14. Bibi W, Bachmann MR (1997) The fate of thiocyanate in the lactating bovine. *Milchwissen* 52:8-10.
15. Björck L (1982) Activation of the lactoperoxidase system as a mean of preventing bacterial deterioration of raw milk. *Kieler Milchwirt Forchungs* 34:5-11.
16. Björck L, Claesson O, Schulthess W (1979) The lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. *Milchwissen* 34:726-729.
17. Björck L (1978) Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotropic bacteria in milk. *J Dairy Res* 45:109-118.
18. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.
19. Borch E, Kant-Muermans M-L, Blixt Y (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol Spec Spoil Organisms* 33:103-120.
20. Bosch EH, van Doorne H, de Vries S (2000) The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *J Appl Microbiol* 89:215-224.
21. Boussouel N, Mathieu F, Revol-Junelles A-M, Millièrre J-B (2000) Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. *Int J Food Microbiol* 61:169-175.
22. Boussouel N, Mathieu F, Benoit V, Linder M, Revol-Junelles AM, Millièrre JB (1999) Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxidase system, Nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *J Appl Microbiol* 86:642-652.
23. Brenner DJ (1988) Phylogenetic classification of bacteria and recent developments in bacterial classification and nomenclature: Impact on clinical microbiology. *Clin Microbiol Newsletter* 10:153-156.
24. Brillet A, Pilet MF, Prevost H, Bouttefroy A, Leroi F (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* 97:1029-1037.
25. Brillet A, Pilet M-F, Prevost H, Cardinal M, Leroi F (2005) Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* 104:309-324.
26. Brownlie LE (1966) Effect of some environmental factors on psychrophilic microbacteria. *J Appl Bacteriol* 29:447-454.

27. Cailliez-Grimal C, Revol-Junelles A-M, Linder M, Millière J-B (2002) Antimicrobial activity spectra of the glucose/glucose-oxidase and the lactoperoxidase systems ( $\text{SCN}^-$ ) modified by  $\text{I}^-$  or  $\text{IO}_3^-$  anion. *Milchwissen* 57:656-660.
28. Cann DC, Houston NC, Taylor LY, Smith GL, Thomson AB, Craig A (1984) Studies of salmonids packed and stored under a modified atmosphere. *Torry Res Sta* 13:21-32.
29. Cardinal M, Gunnlaugsdottir H, Bjoernevik M, Ouisse A, Vallet LJ, Leroi F (2004) Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Res Int* 37:181-193.
30. Carlsson J (1983) Catalatic activity of lactoperoxidase in the presence of SCN. *Biochem Biophys Res Commun* 116:568-573.
31. Castell CH (1950) The influence of trimethylamine oxide on the bacterial reduction of redox indicators. *J Fish Res Bd Can* 7:567-575.
32. Castell GH, Greenough MF (1957) The action of *Pseudomonas* on fish muscle. 1. Organisms responsible for odours produced during incipient soipolage of chilled muscle. *J Fish Res Board Can* 14:617.
33. Castell GH, Greenough MF (1959) The action of *Pseudomonas* on fish muscle. 4. Relation between substrate composition and the development of odours by *Pseudomonas fragi*. *J Fish Res Board Can* 16:21.
34. Castell GH, Greenough MF, Jenkin NL (1957) The action of *Pseudomonas* on fish muscle. 2. Musty and potato-like odours. *J Fish Res Can* 14:775.
35. Castell GH, Greenough MF, Jenkin NL (1959) The action of *Pseudomonas* on fish muscle. 3. Identification of organisms producing fruity and oniony odours. *J Fish Res Bord Can* 16:13.
36. Cheftel JC, Cheftel H (1984) Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, Tec. Doc. Lavoisier Edition. Paris.
37. Chen JH, Hotchkiss JH (1993) Growth of *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes* in cottage cheese in modified atmosphere packaging. *J Dairy Sci* 76:972-977.
38. Clem WH, Klebanoff SJ (1966) Inhibitory effect of saliva on glutamic acid accumulation by *Lactobacillus acidophilus* and the role of the lactoperoxidase-thiocyanate system. *J Bacteriol* 91:1848-1853.
39. Collins-Thompson DL, Sen NP, Aris B, Schwinghamer L (1972) Non-enzymic *in vitro* formation of nitrosamines by bacteria isolated from meat products. *Can J Microbiol* 18:1968-1971.

40. Collins MD, Farrow JAE, Philips AE, Feresu S, Jones D (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rodshaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 37:310-316.
41. Conner DE, Brackett RE, Beuchat LR (1986) Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl Environ Microbiol* 52:59-63.
42. Courtois P, van Beers D, de Foor M, Mandelbaum IM, Pourtois M (1990) Abolition of herpes simplex cytopathic effect after treatment with peroxidase generated hypothyocyanite. *J Biol Buccale* 18:71-74.
43. Creighton TE (1984) Pathways and mechanisms of protein folding. *Advances Biophys* 18:1-20.
44. Cutting CL (1953) Changes in the pH and buffering capacity of fish during spoilage. *J Sci Food Agric* 4:597-603.
45. Dainty RH, Mackey BM (1992) The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J Appl Bacteriol* 73:103-114.
46. Dalgaard P (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int J Food Microbiol* 26:319-333.
47. Dalgaard P, Gram L, Huss HH (1993) Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int J Food Microbiol* 19:283-294.
48. Daneshvar MI, Brooks JB (1989) Analyses of fermentation products of *Listeria* species by frequency-pulsed electron-capture gas-liquid chromatography. *Can J Microbiol* 35:139-146.
49. Davidson CM, Mobbs P, Stubbs JM (1968) Some morphological and physiological properties of *Microbacterium thermosphactum*. *J Appl Bacteriol* 31:551-559.
50. Davis GH, Newton KG (1969) Numerical taxonomy of some named coryneform bacteria. *J Gen Microbiol* 56:195-214.
51. Davis GH, Fomin L, Wilson E, Newton KG (1969) Numerical taxonomy of *Listeria*, *Streptococci* and possibly related bacteria. *J Gen Microbiol* 57:333-348.
52. de Silva NN, Hughes RB (1960) Effect of tetracycline antibiotics on the proteolysis of fish muscle. *Nature* 188:663.
53. De Vuyst L, Vandamme EJ (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications* (De Vuyst L, Vandamme, E.J., ed), pp 91-142. Glasgow: Blackie Academic and Professional.
54. de Witt JN, van Hooydonk ACM (1996) Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth Milk Dairy J* 50:227-244.

55. Denis F, Ramet J-P (1989) Activité antibactérienne du système lactoperoxydase sur *Listeria monocytogenes*. Microbiol - Alim - Nutr 7:25-30.
56. Dionysius DA, Grieve PA, Vos AC (1992) Studies on the lactoperoxidase system: reaction kinetics and antibacterial activity using two methods for hydrogen peroxide generation. J Appl Bacteriol 72:146-153.
57. Dixon M, Webb EC (1964) Enzymes, Longmans Edition. London.
58. Doehlert DH (1970) Uniform shell designs. Appl Stat 19:231-239.
59. Dondero M, Egaña V, Tarky W, Cifuentes A, Torres JA (1993) Glucose oxidase/catalase improve preservation of shrimp (*Heterocarpus reedi*). J Food Sci 58:774-779.
60. Duffes F, Corre C, Leroi F, Dousset X, Boyaval P (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. J Food Prot 62:1394-1403.
61. Duffes F, Leroi F, Boyaval P, Dousset X (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. Int J Food Microbiol 47:33-42.
62. Dufour M, Simmonds RS, Bremer PJ (2003) Development of a method to quantify *in vitro* the synergistic activity of "natural" antimicrobials. Int J Food Microbiol 85:249-258.
63. Dull TJ, Uyeda C, Strosberg AD, Nedwin G, Seilhamer JJ (1990) Molecular cloning of cDNAs encoding bovine and human lactoperoxidase. DNA Cell Biol 9:499-509.
64. Dyer WJ (1945) Amines in fish muscle. 1. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. J Fish Res Board Can 6:351-358.
65. Edima HC (2005) *Carnobacterium maltaromaticum*, flore d'affinage de fromage à pâte molle? In: DEA ESAIA. Vandoeuvre-lès-Nancy: INPL.
66. Elliot RM, McLay JC, Kennedy MJ, Simmonds RS (2004) Inhibition of foodborne bacteria by the lactoperoxidase system in a beef cube system. Int J Food Microbiol 91:73-81.
67. Elotmani F, Assobhei O (2004) *In vitro* inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. Lett Appl Microbiol 38:60-65.
68. Ferrari RP, Laurenti E, Cecchini PI, Gambino O, Sondergaard I (1995) Spectroscopic investigations on the highly purified lactoperoxidase Fe(III)-heme catalytic site. J Inorg Biochem 58:109-127.
69. Field CE, Pivarnik LF, Barnett SM, Rand AG (1986) Utilization of glucose oxidase for extending shelf-life of fish. J Food Sci 51:66-70.

70. FIL/IDH (1988) Code of practice for the preservation of raw milk by the lactoperoxidase system. Bull Int Dairy Fed.
71. Fletcher SA, Csonka LN (1998) Characterization of induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. Food Microbiol 15:307-317.
72. Frederick KR, Tung J, Emerick KS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, Rosenberg S, Cakraborty S, Schopfer LM (1990) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of yeast derived enzyme. J Biol Chem 265:3793-3802.
73. Garcia-Graells C, Valckx C, Michiels CW (2000) Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. Appl Environ Microbiol 66:4173-4179.
74. Garcia-Graells C, Van Opstal I, Vanmuysen SC, Michiels CW (2003) The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. Int J Food Microbiol 81:211-221.
75. Gauthier G, Gauthier M, Christen R (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. Int J Syst Bacteriol 45:755-761.
76. Georges SM, Lund BM, Brocklehurst TF (1988) The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol 6:153-156.
77. Gibbons NE, Reed GB (1930) The effect of autolysis in sterile tissues on subsequent decomposition. J Bacteriol 19:73.
78. Gilbert J (1975) The chemistry of smoked food. J Sci Food Agric 10:245-261.
79. Gouygou J, Siquin C, Etienne M, Landrein A, Durand P (1987) Quantitative and qualitative determination of biogenic amines in fish. Res Exp:178-186.
80. Gram L, Melchiorsen J (1996) Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. J Appl Bacteriol 80:589-595.
81. Gram L, Huss HH (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. Int J Food Microbiol 33:121-137.
82. Granroth B, Kiesvaara M, Pitkaeniemi M (1978) Exopeptidases in Baltic herring. Finn Chem Lett:108-111.
83. Griffiths MW (1986) Use of milk enzymes as indices of heat treatment. J Food Prot 49:696-705.

- 
84. Haddadin MS, Ibrahim SA, Robinson RK (1996) Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control* 7:149-152.
  85. Hamm R (1977) Postmortem breakdown of ATP and glycogen in ground muscle: A review. *Meat Sci* 1:15-39.
  86. Hamon CB, Klebanoff SJ (1973) A peroxidase mediated, *Streptococcus mitis*-dependant antimicrobiol system in saliva. *J Exp Med* 137:438-450.
  87. Haouz A (1994) Etude comparative de la glucose oxydase soluble et immobilisée. Quelques applications biotechnologiques des enzymes immobilisées. In: *Biochimie. Paris* 7.
  88. Haouz A, Glandieres JM, Alpert B (2001) Involvement of protein dynamics in enzyme stability: The case of glucose oxidase. *FEBS Letters* 506:216-220.
  89. Herbert RA, Hendrie MS, Gibson DM, Shewan JM (1971) Symposium on microbial changes in foods. Bacteria active in the spoilage of certain sea foods. *J Appl Bacteriol* 34:41-50.
  90. Herbin S, Mathieu F, Brulé F, Branlant C, Lefebvre G, Lebrihi A (1997) Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Curr Microbiol* 35:319-326.
  91. Hernandez MCM, van Markwijk BW, Vreeman HJ (1990) Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Neth Milk Dairy J* 44.
  92. Hobbs G, Hodgkiss W (1982) The bacteriology of fish handling and processing. *Appl Sci Processing Dev* 3:217-229.
  93. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M (1997) Management of listeriosis. *Cli Microbiol Rev* 10:345-357.
  94. Holck A, Axelsson L, Schillinger U (1994) Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Curr Microbiol* 29:63-68.
  95. Holck A, Axelsson L, Schillinger U (1996) Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. *FEMS Microbiol Lett* 136:163-168.
  96. Holtz CM, Stahl U (1995) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Food Biotechnol* 9:85-117.
  97. Hui YH (1993) *Product manufacturing dairy science and technology handbook*: VCH.
  98. Huss HH (1988) *Le poisson frais: qualité et altération de la qualité. Manuel de formation préparé pour le programme de perfectionnement FAO/DANIDA sur la technologie du poisson et le contrôle de la qualité*. Paris.
  100. Huss HH, Eskildsen V (1974) Botulism in farmed trout caused by *Clostridium botulinum* type E. *Nord Vet-Med* 26:733-738.

101. Huss HH, Jeppesen VF, Johansen C, Gram L (1995) Biopreservation of fish products - A review of recent approaches and results. *J Aquat Food Prod Technol* 4:5-26.
102. Ita PS, Hutkins RW (1991) Intracellular pH and survival *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acid. *J Food Prot* 54:15-19.
103. Ivanova EP, Mikhailov VV (2001) A new family of *Alteromonadaceae* fam. nov., including the marine proteobacteria species *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina Colwellia*. *Mikrobiologiia* 70:15-23.
104. Jack RW, Wan J, Gordon J, Harmark K, Davidson BE, Hillier AJ, Wettenhall REH, Hickey MH, Coventry MJ (1996) Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl Environ Microbiol* 62:2897-2903.
105. Jacquot M, De Donato P, Barres O, Pons MN, Scher J, Miclo A, Poncelet D (2002) Physicochemical characterisation of the lactoperoxidase system powders: comparison of two drying techniques. *Powder Technol* 128:205-212.
106. Jago GR, Morrison M (1962) Anti streptococcal activity of lactoperoxidase. *Proc Soc Exp Biol Med* III:585-588.
107. Jantschko W, Furtmuller PG, Zederbauer M, Neugschwandtner K, Jakopitsch C, Obinger C (2005) Reaction of ferrous lactoperoxidase with hydrogen peroxide and dioxygen: an anaerobic stopped-flow study. *Archives Biochem Biophys* 434:51-59.
108. Jason AC, Lees A (1971) Estimation of fish freshness by dielectric measurement. *Torry Res Sta* 2:19-26.
109. Joffraud JJ, Leroi F, Chevalier F (1998) Development of a sterile cold-smoked fish model. *J Appl Microbiol* 85:991-998.
110. Joffraud JJ, Leroi F, Roy C, Berdague JL (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* 66:175-184.
111. Jones NR, Murray J (1964) Rapid measures of nucleotide dephosphorylation in iced fish muscle: their value as indices of freshness and of inosine5'-monophosphate concentration. *J Sci Food Agri* 15:684-690.
112. Joosten HM, Northolt LJ (1989) Detection, growth and amine-producing capacity of *Lactobacilli* in cheese. *Appl Environ Microbiol* 55:2356-2359.
113. Jouve JL, Dromigny E, Vincent P (1991) Physiologie des organes animaux. In: *Sciences et Technologies Alimentaires* (Apria L-, ed), pp 45-61. Paris.
114. Juntilla JR, Niemela SI, Hirn J (1988) Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and nonhaemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* 65:321-327.



- 
115. Justine N (1985) Ionisation- gadget ou révolution. *Filière viande* 79:16-20.
116. Juven BJ, Pierson MD (1996) Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification. *J Food Prot* 59:1233-1241.
117. Kamau DN, Kroger M (1984) Preservation of raw milk by treatment with hydrogen peroxide and by activation of the lactoperoxidase (LP) system. *Milchwissen* 39:658-661.
118. Karmas E (1981) Biogenic amines as indicators of seafood freshness. *Leb WissenTechnol* 14:273-275.
119. Karmas E, Mietz JL (1978) Polyamine and histamine content of tuna fish and the relationship to decomposition. *Wiss U Technol* 11:333-337.
120. Katla T, Moretro T, Aasen IM, Holck A, Axelsson L, Naterstad K (2001) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol* 18:431-439.
121. Kennedy M, O'Rourke AL, McLay J, Simmonds R (2000) Use of a ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. *Int J Food Microbiol* 57:147-158.
122. Kikuchi S, Ishimoto M (1980) Nitrate respiration of *Klebsiella pneumoniae* on amino acid, especially on serine. *Z Allgem Mikrobiol* 20:405-413.
123. Ko R, Smith LT, Smith GM (1994) Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 176:426-431.
124. Kohler H, Jenzer H (1989) Interaction of lactoperoxidase with hydrogen peroxide. Formation of enzyme intermediates and generation of free radicals. *Free Radic Biol Med* 6:323-339.
125. Korhonen H (1980) A new method for preserving raw milk. The lactoperoxidase antibacterial system. *World Anim Rev* 35:23-29.
126. Korhonen HJ, Reiter B (1983) Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by bovine blood and milk polymorphonuclear leucocytes. *Acta Microbiol Pol* 32:53-64.
127. Kreit J, Lefebvre G, Elhichami A, Germain P, Saghi M (1992) A colorimetric assay for measuring cell-free and cell-bound cholesterol oxidase. *Lipids* 27:458-465.
128. Kumar R, Mathur BN (1994) Oxidative stability of lipids in ghee and paneer prepared from milk preserved by LP-system. *Ind J Dairy Sci* 47:420-423.
129. Kussendrager K (1994) Lactoferrin and lactoperoxidase bio-active milk proteins. *Food Technol*:39-43.

130. Kussendrager KD, van Hooijdonk AC (2000) Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br J Nutr* 84 Suppl 1:S19-25.
131. Langley-Danysz P (1989) Lacto-protéines: le lait antimicrobien. *RIA* 423.
132. Lara R, Mendoza A, De la Cruz I, Garcia HS (1987) Effect of the lactoperoxidase system on yield and characteristics of fresh-type cheese. *Milchwissen* 42:772-775.
133. Law BA, John P (1981) Effect of the lactoperoxidase bactericidal system on the formation on the electrochemical proton gradient in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 10:67-70.
134. Leblanc L, Leroi F, Hartke A, Auffray Y (2000) Do stresses encountered during the smoked salmon process influence the survival of the spoiling bacterium *Shewanella putrefaciens*? *Lett Appl Microbiol* 30:437-442.
135. Leisner JJ, Tideman J, Larsen LM (1994) Catabolism of arginine by *Carnobacterium* spp. isolated from vacuum sugar-salted fish. *Curr Microbiol* 29:95-99.
136. Lerke P, Adams R, Farber L (1963) Bacteriology of Spoilage of Fish Muscle. I. Sterile Press Juice as a Suitable Experimental Medium. *Appl Microbiol* 11:458-462.
137. Leroi F, Joffraud JJ (2000) Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5 °C storage predicted using factorial design. *J Food Prot* 63:1222-1227.
138. Leroi F, Joffraud JJ, Chevalier F (2000) Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 °C as estimated by the factorial design method. *J Food Prot* 63:502-508.
139. Leroi F, Arbey N, Joffraud JJ, Chevalier F (1996) Effect of an inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf life of vacuum-packed cold-smoked salmon. *Int J Food Sci Technol* 31:497-504.
140. Leroi F, Joffraud J-J, Chevalier F, Cardinal M (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *Int J Food Microbiol* 39:111-121.
141. Levin RE (1968) Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. I. Methodology. *Appl Microbiol* 16:1734-1737.
142. Liston J (1980) Health and safety of sea-foods. *Food Biotechnol Aust* 32:428-436.
143. Lobben JC, Lee JS (1968) Roles of microorganisms in the deterioration of rockfish. *Appl Microbiol* 16:1320-1325.
144. López-Sabater E, Rodriguez-Jerez J, Roig-Sagues AX, Mora-Ventura M (1994) Bacteriologic quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine. *J Food Prot* 57:318-323.

145. Luong JHT, Male KN (1992) Development of a new biosensor system for the determination of the hypoxanthine ratio, an indicator of fish freshness. *Enzym Microbiol Technol* 14:125-130.
146. Malle P (1992) Thèse. Microbiologie des poissons marins: évaluation expérimentale de l'altération. In. Lille: UST.
147. Marcozzi G, Di Domenico C, Spreti N (1998) Effects of surfactants on the stabilization of the bovine lactoperoxidase activity. *Biotechnol Progress* 14:653-656.
148. Marshall VME, Reiter B (1980) Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J Gen Microbiol* 120:507-514.
149. Mathieu D, Phan-Tan-Luu R (1997) Nemrod<sup>®</sup>: New efficient methodology for research using optical design. In: LPRAI Université d'Aix-Marseille.
150. Mathieu F, Michel M, Lefebvre G (1993) Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5. *Biotechnol Lett* 15:587-590.
151. Mc Lauchlin J (1997) The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. *Med Microbiol* 8:1-14.
152. McDonnell MT, Colwell RR (1985) Dot matrix analysis of nucleic acid sequences: an interactive microcomputer program. *J Microbiol Met* 3:247-254.
153. McLay JC, Kennedy MJ, O'Rourke AL, Elliot RM, Simmonds RS (2002) Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *Int J Food Microbiol* 73:1-9.
154. Metivier A, Pilet M, Dousset X, Sorokine O, Anglade P, Zagorec M, Piard J, Marion D, Cenatiempo Y, Fremaux C (1998) Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiol* 144:2837-2844.
155. Metwally MMK, Nasr MM (1992) Preservation of raw milk by activation of the lactoperoxidase system. *Egypt J Food Sci* 20:175-196.
156. Meyrand A, Atrache V, Bavai C, Montet MP, Vernozi-Rozand C (1999) Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy product. *Lett Appl Microbiol* 28:411-415.
157. Mickelson MN (1966) Effect of lactoperoxidase and thiocyanate on the growth of *Streptococcus pyogenes* as *Streptococcus agalactiae* in chemically defined culture medium. *J Gen Microbiol* 43:31-43.
158. Mickelson MN (1977) Glucose transport in *Streptococcus agalactiae* and its inhibition by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 132:541-548.
159. Mietz JL, Karmas E (1977) Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. *J Food Sci* 42:155-158.

- 
160. Miller Ar, Scanlan RA, Lee JS, Libbey LM (1973a) Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. Appl Microbiol 25:952-955.
161. Miller Ar, Scanlan RA, Lee JS, Libbey LM (1973b) Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, and an *Achromobacter* species. Appl Microbiol 26:18-21.
162. Millière JB, Michel M, Mathieu F, Lefebvre G (1994) Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. J Appl Bacteriol 76:264-269.
163. Miron J, Gonzalez MP, Vazquez JA, Pastrana L, Murado MA (2004) A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions. Enz Microbial Technol 34:513-522.
164. Mitsuhiro O, Katsuhiko A, Toyoki K (1999) Activity and stability of glucose oxidase in molecular films assembled alternately with polyanions. J Biosci Bioeng 17:69-75.
165. Montel MC, Talon R, Fournaud J, Champomier MC (1991) A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. J Appl Bacteriol 70:469-472.
166. Mora D, Scarpellini M, Franzetti L, Colombo S, Galli A (2003) Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller *et al.* 1974) DSM 20342<sup>T</sup> and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins *et al.* 1987) DSM 20730<sup>T</sup> and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53:675-678.
167. Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. J Lip Res 5:600-608.
168. Mulak V, Eb P, Becel P, Tailliez R (1992) Bactériologie des produits de la mer: caractérisation des flores bactériennes après traitement thermique. Sci Alim 12:415-428.
169. Neumann NP (1967) Oxidation with hydrogen peroxide. In: Methods in Enzymology - Enzyme Structure (Hirs CHW, ed), pp 485-487: Academic Press.
170. Nickerson JTR, Goldblith SA, Proctor BE (1950) A comparison of chemical changes in mackerel tissues treated by ionizing radiation. Food Technol 4:84-88.
171. Nicol MJ, Duke FR (1966) Substrate inhibition with glucose oxidase. J Biol Chem 241:4292-4293.
172. Nilsson L, Gram L, Huss HH (1999) Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. J Food Prot 62:336-342.
173. Noguera NM, Klebanoff SJ, Cohn ZA, Cruz T (1982) Sensitization to macrophage killing by eosinophil peroxidase. J Immunol 128:1705-1708.

- 
174. O'Brien PJ (2000) Peroxidases. *Chem-Biol Int* 129:113-139.
  175. Oram JD, Reiter B (1966) The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The effect of the inhibitory system on susceptible and resistant strains of group N streptococci. *Biochem J* 100:382-383.
  176. Owen RJ, Legros RM, Lapage SP (1978) Base composition, size and sequence similarities of genome deoxyribonucleic acids from clinical isolates of *Pseudomonas putrefaciens*. *J Gen Microbiol* 104:127-138.
  177. Paludan-Muller C, Dalgaard P, Huss HH, Gram L (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5°C. *Int J Food Microbiol* 39:155-166.
  178. Pantev A, Kabadjova P, Dalgarrondo M, Haertle T, Ivanova I, Dousset X, Prevost H, Chobert J (2002) Isolation and partial characterization of an antibacterial substance produced by *Enterococcus faecium*. *Folia Microbiol* 47:391-400.
  179. Papageorgiou DK, Marth EH (1989) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of blue cheese. *J Food Prot* 52:497-502.
  180. Patchett RA, Kelly AF, Kroll RG (1992) Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *App Env Microbiol* 58:3959-3963.
  181. Perraudin JP (1991) Protéines à activités biologiques: lactoferrine et lactoperoxydase. Connaissances récemment acquises et technologies d'obtention. *Lait* 71:191-211.
  182. Pine L, Malcolm GB, Brooks JB, Daneshvar MI (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J Microbiol* 35:245-254.
  183. Pitcher WH (1980) Applications and potential of immobilized glucose oxidase-catalase. In: *Immobilized enzymes for food processing* (Pitcher CRC Press BR, ed), pp 196-200. Florida.
  184. Popper L, Knorr D (1997) Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate-system. *Nahrung* 41:29-33.
  185. Prieels JP, Delahaut P, H-Jacquemin E, Kaeckenbeek A (1989) Application du système lactoperoxydase au traitement de la diarrhée colibacillaire chez les veaux. *Ann Med Vet* 133:143-150.
  186. Proctor BE, Goldblith SA, Bates CJ, Hammerle DA (1952) Biochemical prevention of flavour and chemical changes in food and tissues sterilized by ionizing radiations. *Food Technol* 6:237-242.
  187. Quadri LEN, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME (1994) Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J Biol Chem* 269:12204-12211.

188. Rando D, Kohring GW, Giffhorn F (1997) Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:34-40.
189. Reed G, Spence M (1929) The intestinal and slime flora of the haddock - A preliminary report. *Contrib Canad Biol Fisch* 4:257-264.
190. Reiter B (1978) Review of the progress of Dairy science: antimicrobial systems in milk. *J Dairy Res* 45:131-147.
191. Reiter B (1985) Lactoperoxidase of bovine milk. In: *The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance, immunology* (Pruitt KMaT, J.O., ed), pp 123-141. Newyork: Marcel Dekker.
192. Reiter B, Härnolv G (1984) Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J Food Prot* 47:724-732.
193. Reiter B, Perraudin JP (1991) Lactoperoxidase: biological functions. In: *Peroxydases in Chemistry and Biology* (Press BRC, ed), pp 143-180.
194. Reiter B, Pickering A, Oram JD (1964) An inhibitory system - Lactoperoxidase / thiocyanate / peroxide - in raw milk. In: *IV International Symposium on Food Microbiology "Microbial Inhibitors in Food"*, pp 297. Suisse.
195. Reiter B, Marshall VM, BjorckL, Rosen CG (1976) Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidases-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some Gram-negative pathogens. *Infect Immun* 13:800-807.
196. Reiter B, Fulford RJ, Marshall VE, Yarrow N, Ducker MJ, Knutsson M (1981) An evaluation of the growth promoting effect of the lactoperoxidase system in newborn calves. *Anim Prod* 32:297-306.
197. Rementzis J, Samelis J (1996) Rapid GC analysis of cellular fatty acids for characterizing *Lactobacillus sake* and *Lact. curvatus* strains of meat origin. *Lett Appl Microbiol* 23:379-384.
198. Revol-Junelles A-M, Boussouel N, Ramet J-P, Millière J-B (2001) Antibacterial activities of lactoperoxidase system (LP-s) modified by  $\Gamma^-$  and  $\text{IO}_3^-$  anions. *Milchwissen* 56:329-332.
199. Rice SL, Koehler PE (1976) Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. *J Milk Food Technol* 39:166-169.
200. Rodriguez E, Tomillo J, Nunez M, Medina M (1997) Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. *J Appl Microbiol* 83:389-395.

201. Roig-Sagues AX, Hernandez-herrero M, Lõpez-Sabater EI, Rodriguez-Jerez JJ, Mora-Ventura M (1996) Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salchichon, a spanish crued sausage. *J Food Prot* 59:516-5120.
202. Ronald TS (1979) Copper river subsistence fisheries. *J Fish Res Board Can* 21:842.
203. Rosenow EM, Marth EH (1987) Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk and in whipping cream during incubation at 4, 5, 13, 21 and 35°C. *J Food Prot* 50:452-459.
204. Ryser ET, Marth EH (1987) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and the ripening of camembert cheese. *J Food Prot* 50:372-378.
205. Ryser ET, Marth EH (1991) In: *Listeria, listeriosis and food safety* (Dekker M, ed). New York.
206. Saad de Schoos S, Oliver G, Fernandez FM (1999) Relationships between lactoperoxidase system components in Creole goat milk. *Small Rum Res* 32:69-75.
207. Sadovski AY, Levin RE (1969) Extracellular nuclease activity of fish spoilage bacteria, fish pathogens, and related species. *Appl Microbiol* 17:787-789.
208. Sainclivier M (1983) I. Le poisson matière première. In: *L'industrie alimentaire halieutique* (Sciences Agronomiques ENSA R, ed).
209. Sainclivier M (1985) L'industrie alimentaire halieutique. In: *Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines* (Sciences Agronomiques ENSA R, ed).
210. Saito T, Arai K, Matsuyoshi M (1959) A new method for estimating the freshness of fish. *Bull Jap Soc Sci Fish* 24:749-750.
211. Sanchez C (1990) Faisabilité d'un nouveau procédé de protection des surfaces alimentaire. In: DEA ENSAIA. Vandoeuvre-lès-Nancy: INPL.
212. Schleifer KH (1970) The murein types of the genus *Microbacter*. *Arch Mikrobiol* 71:271-282.
213. Schleifer KH, Plapp R, Kandler O (1968) The amino acid sequence of the murein of *Microbacterium lacticum*. *Biochem Biophys Acta* 154:573-582.
214. Seeliger HPR, Jones D (1986) *Listeria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath PHA, Mair, N.S., Shaarpe, M.E., Holt, G.G.H., ed). Baltimore: William and Wilkins.
215. Seifu E, Buys EM, Donkin EF (2005) Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends Food Sc Technol* 16:137-154.
216. Seifu E, Buys EM, Donkin EF, Petzer I-M (2004) Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food Control* 15:447-452.

- 
217. Shandholm M, Ali-Vehmas T, Kaartinen L, Junnikka M (1988) Glucose oxidase (GOD) as source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase (LPO) system in milk: antimicrobial effect of the GOD - LPO system against *Mastitis pathogens*. J Vet Med B35:346-352.
218. Shewan J (1961) The microbiology of sea water fish. In: Fish as food (Press A, ed), pp 487-559. Londres.
219. Shewan JM (1962) The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. In: Recent advances in food science (Leitch JhJM, ed), pp 167-193. Londres.
220. Shewan JM (1977) The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: Handling, Processing and marketing of tropical fish (Inst. Tp, ed), pp 51-66. Londres.
221. Shindler JS, Bardsley WG (1975) Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. Biochem Biophys Res Commun 67:1307-1312.
222. Sikorski ZE (1980) In: Technology of food marine origin (Warsaw W, ed). Pologne.
223. Slowey RR, Eidelman S, Klebanoff SJ (1968) Antibacterial activity of the purified peroxidase from human parotid saliva. J Bacteriol 96:575-579.
224. Sneath PH, Jones D (1976) *Brochothrix*, a new genus tentatively placed in the family *Lactobacillaceae*. Int J Syst Bacteriol 26:102-104.
225. Soudan F, Anquez H, Babezit A (1965) La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques. App Environ Microbiol 67:646-653.
226. Soudan F, Daknof A, Bazin J, Chapel G, Daspét Seynave E (1957) Norms of freshness of fresh fish. I. Evaluation of changes of fresh fish by a systematic organoleptic examination. II. Present state of fresh fish in various big urban centers. Ann Nutr Aliment 11:1-24.
227. Stenberg E, Ringo E, Strom AR (1984) Trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735: Na<sup>+</sup>-stimulated anaerobic transport in cells and membrane vesicles. App Environ Microbiol 47:1090-1095.
228. Stoffels G, Nissen-Meyer J, Gugmundsdottir A, Sletten K, Holo H, Nes IF (1992) Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from *Carnobacterium* sp. Appl Environ Microbiol 58:1417-1422.
229. Sulzbacher WL, McLean R (1951) The bacterial flora of fresh pork sausage. Food Technol 5:7-8.
230. Swan P (1975) The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compound. J Sci Food Agri 26:1761-1770.



- 
231. Swoboda BE, Massey V (1965) Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. J Biol Chem 240:2209-2215.
232. Tarr HLA (1939) The bacterial reduction of thimethylamine oxide to trimethylamine. J Fish Res Board Can 4:367-377.
233. Tarr HLA (1966) Post-mortem changes in glycogen, nucleotides, sugar phosphates and sugars in fish muscles. A review. J Food Sci 31:846-854.
234. Tenovuo J, Mansson-Rahemtulla B, Pruitt KM, Arnold R (1981) Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system. Infect Immun 34:208-214.
235. Thomas EI, Aune TM (1978a) Susceptibility of *Escherichia coli* to bactericidal action of lactoperoxidase, peroxide and iodide or thiocyanate. Antimicrobial Agents Chem 13:261-265.
236. Thomas EL, Aune TM (1978b) Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. Infect Immun 20:456-463.
237. Thornley MJ (1957) Observations on the microflora of minced chicken meat irradiated with 4 Me V cathode rays. J Appl Bacteriol 20:286-293.
238. Touch V, Hayakawa S, Yamada S, Kaneko S (2004) Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on *Salmonella enteritidis* in animal or vegetable foods. Int J Food Microbiol 93:175-183.
239. Truelstrup Hansen L, Gill T, Drewes Rontved S, Huss HH (1996) Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. Food Res Int 29:181-188.
240. Truelstrup Hansen L (1995) Quality of chilled, vacuum packed cold-smoked salmon. In. Copenhagen, Denmark: Danish Institute for fisheries Research and the Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen.
241. Van Hooijdonk AC, Kussendrager KD, Steijns JM (2000) *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defense. Br J Nutr 84 Suppl 1:S127-134.
242. Walker SJ, Archer P, Banks JG (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J Appl Bacteriol 68:157-162.
243. Watson DW (1939) Studies on fish spoilage. IV. The bacterial reduction of trimethylamine oxide. J Fish Res Board Can 4:252-266.
244. Weiss J, Seeliger H (1975) Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl Microbiol 30:29-32.

- 
245. Wendakoon CN, Sakaguchi M (1992) Effect of spices on growth and biogenic amines formation by bacteria in fish muscle. *Qual Ass Fish Indus* 30:305-313.
246. Weuffen W, Kramer A, Julich WD, Schroedre H (1982) Vorkomen bei Mensch und Tier. In: *Medizinische und biologische bedeutung der thiocyanate (rhodanide)* (Weuffen W, ed), pp 123-158. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit.
247. Wever R, Kast WM, Kasinoedin JH, Boelens R (1982) The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochem Biophys Acta* 709:212-219.
248. Wilkinson BJ, Jones D (1977) A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. *J Gen Microbiol* 98:399-421.
249. Wiseman A (1987) Immobilization of glucose oxidase into membranes as sensors for food analysis. *Trends Analytical Chem* 6:9-10.
250. Wolfson LM, Sumner SS (1993) Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. *J Food Prot* 56:887-892.
251. Worobo RW, Henkel T, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME (1994) Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiol* 140:517-526.
252. Worobo RW, Van Belkums MJ, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME (1995) A signal peptide secretion dependant bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J Bacteriol* 177:3143-3149.
253. Ye RW, Averill BA, Tiedje JM (1994) Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Appl Environ Microbiol* 60:1053-1058.
254. Ye RW, Haas D, Ka JO, Krishnapillai V, Zimmermann A, Baird C, Tiedje JM (1995) Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol* 177:3606-3609.
255. Zall RR, Chen JH, Dzurec DJ (1983) Effect of thiocyanate-lactoperoxidase-hydrogen peroxide system and farm heat treatment on the manufacturing cottage cheese and cheddar cheese. *Milchwissen* 38:203-266.
256. Zapico P, Gaya P, Nunez M, Medina M (1991) Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *J Dairy Sci* 74:783-787.
257. Zuckerman H, Ben Avraham R (2002) Control of Growth of *L. monocytogenes* in Fresh Salmon using Microgard<sup>TM</sup> and Nisin. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technol* 35:543-548.
258. Zuggaramurdi A (1976) A model to explain observed behavior on fish salting. *J Food Sci* 45:1305-1311.

259. Zumft WG (1993) The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch Microbiol* 160:253-264.

### **Etude du fonctionnement du système lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis des flores du poisson**

L'étude des réseaux uniformes de Doehlert a conduit à la compréhension des interactions entre les constituants du LP-s et à l'optimisation de leur concentration. A 25 °C, la peroxydation du SCN<sup>-</sup> est augmentée par le glucose et la LPO, et est affectée par les interactions GOD/glucose, GOD/pH et LPO/pH. Le LP-s optimisé avec une concentration initiale en SCN<sup>-</sup> de 50 mg.l<sup>-1</sup> est composé de 85,5 UI.l<sup>-1</sup> de GOD, de 1,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose et de 3930 UI.l<sup>-1</sup> de LPO avec un pH initial de 6,5. L'activité inhibitrice de ce LP-s optimisé a été expérimentée sur la croissance de *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, de *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> et de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> en cultures pures et mixtes, à 4 °C, en milieu TSB-YE et en milieu modèle poisson créé pour cette étude. En milieu TSB-YE et en cultures pures et mixtes, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> est la plus affectée par la présence du LP-s. En milieu modèle et en cultures pures, la croissance des quatre souches tests est très affectée par la présence du LP-s. En milieu modèle et en culture mixte, les croissances de *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> et *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> sont totalement inhibées ; dans ces conditions, le LP-s a un effet uniquement bactériostatique sur la croissance de *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup>.

**Mots clés :** système lactoperoxydasique, *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Shewanella putrefaciens*, milieu modèle poisson, inhibiteur bactérien, microbiologie alimentaire

### **Study of the lactoperoxidase system process and validation of its inhibitory effect against fish flora**

Experimental design using Response Surface Methodology permit the well understanding of interactions between LP-s components and its concentration optimisation. At 25°C, SCN<sup>-</sup> peroxidation is increased by glucose and LPO. GOD/glucose, GOD/pH and LPO/pH interactions affect it. 85.5 UI.l<sup>-1</sup> of GOD, 1.5 g.l<sup>-1</sup> of glucose and 3930 UI.l<sup>-1</sup> of LPO with an initial pH value of 6.5 compose optimised LP-s, with an initial SCN<sup>-</sup> concentration of 50 mg.l<sup>-1</sup>. Inhibitory activity of the optimised LP-s was experimented on the growth of *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup>, of *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, of *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup> and of *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup> on single or mixed cultures, at 4°C, in TSB-YE medium or fish model medium created for this study. In TSB-YE medium, in single or mixed cultures, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> is the most affected by the LP-s. In model medium with single cultures, the growth of the four strains is partially inhibited by LP-s. In model medium with mixed cultures, the growth of *S. putrefaciens* CIP 80.40<sup>T</sup>, *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> and *B. thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup> are totally inhibited ; in those conditions, LP-s had a bacteriostatic effect on the growth of *C. maltaromaticum* DSM 20700<sup>T</sup>.

**Key words:** lactoperoxydasic system, *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Shewanella putrefaciens*, fish model medium, bacterial inhibitor, food microbiology