

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

ALOUANE Lamia & BELKADI Soumia

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne de certaines souches de
bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes
résistantes aux antibiotiques*

Soutenu le : 08 / 07 / 2019

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr. REMINI. H

MCB.

Univ. de Bouira

Président

Mme. BENBARA. T

MAA

Univ. de Bouira

Promotrice

Mr. CHERGUI. A

MAA

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciement

Avant tous, nous remercions du plus profond de notre cœur, « Allah » tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir illuminé et ouvert les portes du savoir, merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Au terme de ce travail, il est agréable de présenter nos remerciements les plus sincères à Mme BENBARA T, pour nous avoir acceptées d'encadrer et d'orienter tout au long de notre travail avec ses judicieux conseils et sa constante disponibilité. C'est grâce à sa compétence que ce travail a pu être réalisé.

Nous vifs remerciements vont également aux membres de jury qui ont bien voulu accepter d'examiner notre travail :

Monsieur REMINI d'avoir accepté de présider le jury

Monsieur CHERGUI d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

A tous les enseignants qui ont contribué à notre formation durant notre cursus.

Nous exprimons nos profondes gratitudees à Monsieur Madi Ali le chef de laboratoire bactériologique de l'hôpital EPH de Lakhdaria pour son bon humeur, sa patience, ses conseils et son aide précieuse, ainsi que Monsieur Toubal Ahssen et les laborantines Amina et Naziha.

A toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.

Merci.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux personnes qui comptent le plus pour moi, à ceux qui m'ont soutenu tout le long de ma vie et de mes études, à mes chers parents. Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie. Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude. Que Dieu vous bénisse et vous protège.

A mes chers frères Belkacem et Amine

A mes chers sœurs Karima, Rabia et Nassima.

A mes beaux-frères Azzedine et Rachid

A mes très chers neveux et nièces.

A mes amies Soumia et Warda.

Lamia

Dédicace

Chaque jour qui passe je remercie Allah, et je le pris tout le temps de me donner la force de suivre le chemin qu'il m'a tracé afin de mener à bien le destin qu'il m'a prévu.

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents que j'aime et qui m'ont soutenu tout au long de ma vie et de mes années d'études. Je les remercie vraiment pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements et qui m'ont donné toutes les chances pour réussir jusqu'au bout, que Dieu leur accorde une longue vie les protège, et encore une fois Merci !!

A toute l'équipe de laboratoire de service de laboratoire médical de l'hôpital EPH en particulier Monsieur Madi Ali le chef de laboratoire bactériologique, Monsieur Toubal Ahssen, Mme Amina et Mme Naziha.

A mes chers frères Abdeslam, Yahia et Ilyes

A mes tantes, spécialement Messaouda et Rebiha.

A mon oncle Abderahmen et sa femme Lamia

A mon amie et ma sœur Alouane Lamia avec qui j'ai partagé des moments inoubliables pour son soutien morale, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde considération, et grâce à elle que j'ai compris c'est quoi la vrai amitié.

A mes chères amies et mes collègues, Soumia et Siham.

Enfin, à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. Et Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

A vous tous, un grand Merci.

Soumia

La liste d'abréviation

ADH : Arginine dihydrolase (acide aminée).

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique Ribosomique

AK : Amikacine

AMC : Amoxicilline+Acide Clavulanic

AMP : Ampicilline

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique Messenger

ARNt : Acide ribonucléique transférase

BHIB : Bouillon cœur cervelle

BGT : Bouillon glucose Tamponné

BN : Bouillon nutritif

C : chloramphenical

CL : Colistine

CN : céfalexine

COT : Co-trimoxazole

CTX : Céfotaxime

CZ : Cifazoline

DCI : Dénomination Commune Internationale

E : Echantillon

EMB : Eosine bleu de méthylène

GEN : Gentamycine

G + C : Guanine + Cytosine

La liste d'abréviation

GN : Gélose nutritive

GNM : Gélose nutritive molle

GRAS : Generally Recognized As Safe

H₂O₂ : L'eau oxygénée

I : Intermédiaire

K : Kanamycine

KTG : kanamycine, Tobramycine et Gentamicine

LDC : Lysine décarboxylase (acide aminée).

MH : Mueller-Hinton

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

NA : Nalidixic

NO : Nitroxoline

ODC : Ornithine décarboxylase (acide aminée).

ONPG : Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside

OX : Oxacilline

P¹⁰ : Pénicilline-G

pH : potentiel hydrogène

PLP : protéines liant les pénicillines

Ppm : part par million

R : Résistante.

RIF : Rifampicine

RM : Rouge de Methylene

La liste d'abréviation

S : Sensible.

SR : Spiramycine

TOB : Tobramycine

TSI : Triple sugar iron.

VA : vancomycine

VPI : Réactif I de Voges Proskauer

VP 1 : Vosgues –Proskauer 1

VP 2 : Vosgues –Proskauer 2

µl : microlitre

La liste des figures

Figure 01: Les deux types de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	09
Figure 02: Principaux mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	12
Figure 03 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques.....	15
Figure 04 : Observation au microscope électronique à transmission de <i>Lactobacillus sp</i> (GX10000)	16
Figure 05 : Observation au microscope électronique à balayage de <i>Lactococcus lactis</i> (GX10000).....	16
Figure 06 : Observation au microscope électronique à balayage de <i>Streptococcus thermophilus</i> (GX7000).....	17
Figure 07 : Observation au microscope électronique <i>Enterococcus faecium</i> (GX4000).....	18
Figure 08 : Observation au microscope électronique à balayage de <i>Pediococcus acidilactici</i> (GX10000).....	18
Figure 09 : Observation au microscope électronique à balayage de <i>Bifidobacterium animalis</i> (GX10000).....	19
Figure 10 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques.....	25
Figure 11 : Les disques d'antibiotiques.....	31
Figure 12 : l'enrichissement dans de bouillon MRS.....	33
Figure 13 : l'ensemencement des bactéries lactiques sur gélose MRS.....	34
Figure 14: Tambour à fermeture hermétique.....	34
Figure 15 : Les eppendorfs stériles.....	35
Figure 16: Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots.....	37
Figure 17 : Aspect des colonies des souches pathogènes isolées.....	39

La liste des figures

Figure 18 : Observation microscopique des souches pathogènes par microscope photonique G10X100.....	40
Figure 19 : Aspect de milieu TSI.....	42
Figure 20 : Aspect de milieu Urée-indole.....	42
Figure 21 : Aspect de milieu Urée-indole.....	43
Figure 22 : Aspect de milieu Clark et Lubs.....	44
Figure 23 : Aspect de milieu mannitol mobilité.....	44
Figure 24 : Aspect de LDC. ODC. ADH.....	45
Figure 25 : Aspect de milieu Citrate de Simmons.....	46
Figure 26 : Résultat du Test ONPG	46
Figure 27 : Résultat positif du test catalase.....	47
Figure 28 : Résultat positif du test d'oxydase.....	47
Figure 29 : Résultat positif du test coagulase.....	48
Figure 30 : L'antibiogramme <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Figure 31 : L'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> 604.....	53
Figure 32 : L'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> 620.....	53
Figure 33 : L'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> 63.....	53
Figure 34 : L'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> 1.....	54
Figure 35 : L'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> 2.....	54
Figure 36 : L'antibiogramme de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	54
Figure 37 : Aspect des isolats ensemencés dans le bouillon MRS après 24h d'incubation à 37°C.....	56
Figure 38 : Aspect des isolats ensemencés sur gélose MRS après 48h d'incubation à 37°C....	56

La liste des figures

Figure 39 : Observation microscopiques des isolats après une Coloration de Gram (G×100).....	57
Figure 40 : Résultat négative de teste catalase des bactéries lactiques.....	57
Figure 41 : Résultats du test de spots des souches lactiques à l'égard de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i>	58
Figure 42 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène <i>Escherichia coli</i> ...	58
Figure 43 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Figure 44 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Figure 45 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
Figure 46 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de souches pathogènes Gram positif et Gram négatif.....	61
Figure 47 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de souches pathogènes sensibles.....	63
Figure 48 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de souches pathogènes résistantes.....	64
Figure 49 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de souches pathogènes sensibles et résistantes.....	66

La liste des tableaux

Tableau 01 : Classification des bactériocines des bactéries lactiques.....	23
Tableau 02 : Origine de différents prélèvements effectués.....	26
Tableau 03 : Galerie biochimique classique d'identification des souches.....	29
Tableau 04 : Présentation des échantillons des bactéries lactiques.....	32
Tableau 05 : Tableau d'identification biochimique des bactéries pathogènes.....	41
Tableau 06 : Les espèces pathogènes identifiées par la galerie classique.....	48
Tableau 07 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées (les souches <i>E. coli</i> sensibles).....	49
Tableau 08 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées, (les souches <i>E. coli</i> récolté au niveau de l'hôpital).....	49
Tableau 09 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées, (<i>S. aureus</i>).....	50
Tableau 10 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées, (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	51
Tableau 11 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées, (<i>Klebsiella pneumoniae</i>).....	52
Tableau 12 : Les souches lactiques identifiées.....	55

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
Chapitre I : la résistance bactérienne aux antibiotiques	
1. Les antibiotiques	03
1.1.Historique.....	03
1.2.Définition.....	03
1.3.Nomenclature.....	04
1.4.Classification.....	04
1.5.Mode d'action des antibiotiques.....	04
1.5.1. Action sur la paroi bactérienne.....	05
1.5.2. Action sur la membrane cytoplasmique et la membrane extérieure des bactéries Gram négatif.....	05
1.5.3. Action sur la réplication de l'ADN.....	05
1.5.4. Action sur la traduction de l'ARNm.....	05
2. La résistance aux antibiotiques	05
2.1.Historique.....	05
2.2.Définition.....	07
2.3.Types de résistance aux antibiotiques.....	07
2.4.Types de résistance aux antibiotiques.....	07
2.4.1. Résistance naturelle.....	08
2.4.2. Résistance acquise.....	08
2.5. Les Mécanismes de la résistance acquise.....	09
2.5.1. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise.....	09
2.5.1. a-La résistance chromosomique.....	09
2.5.2. b- La résistance extra-chromosomique (plasmides).....	10
2.5.2. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise.....	10
2.5.2. a- Diminution de la perméabilité et efflux actif.....	10
2.5.2. b-Modification de la cible des antibiotiques.....	10
2.5.2. c-Production d'enzymes inactivant les antibiotiques.....	11

SOMMAIRE

Chapitre II : L'activité antibactérienne des bactéries lactiques

1. Généralité sur les bactéries lactiques	13
1.1.Historique et généralités.....	13
1.2. Ecologie des bactéries lactiques.....	13
1.3.Taxonomie.....	14
1.4.Les genres des bactéries lactiques.....	15
1.4.1. <i>Lactobacillus</i>	15
1.4.2. <i>Lactococcus</i>	16
1.4.3. <i>Streptococcus</i>	17
1.4.4. <i>Enterococcus</i>	17
1.4.5. <i>Pediococcus</i>	18
1.4.6. <i>Bifidobacterium</i>	19
2. L'activité antibactérienne des bactéries lactiques	19
2.1.Les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques.....	19
2.2.Synthèse de métabolites antimicrobiens.....	20
2.2.1. Les acides organiques.....	20
2.2.2. Acides gras.....	20
2.2.3. Le peroxyde d'hydrogène.....	20
2.2.4. Le diacetyl.....	21
2.2.5. Le diacetyl.....	21
2.2.6. La reutérine.....	22
2.2.7. Les bactériocines.....	22
2.2.7. a- Définition.....	22
2.2.7. b- La nature.....	22
2.2.7. c- Les classes des bactériocines.....	23
2.2.7. d-Production des bactériocines.....	24
2.2.7. e- Mode action.....	24

SOMMAIRE

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Lieu de stage.....	26
II. Isolement des bactéries pathogènes.....	26
1. Echantillonnage.....	26
2. Isolement des bactéries pathogènes.....	26
2.1. <i>Escherichia coli</i>	27
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
3. Identification des souches.....	28
3.1. Etude macroscopique.....	28
3.2.Etude microscopique.....	29
3.3.Identification biochimique.....	29
4. Antibiogramme des souches isolées.....	31
III. Isolement des bactéries lactiques.....	32
1. Echantillonnage.....	32
2. Isolement des bactéries lactiques.....	33
2.1.L'enrichissement.....	33
2.2.Isolement sur milieu MRS.....	34
3. Identification des souches.....	35
3.1.L'aspect macroscopique.....	35
3.2.L'aspect microscopique.....	35
3.3.Test de catalase.....	35
4. Purification des souches.....	35
5. Conservation des souches.....	35
IV. L'activité antibactérienne.....	36

SOMMAIRE

Chapitre IV: Résultats et discussion

I. Isolement et purification des bactéries pathogènes	38
1. Isolement.....	38
2. Identification des bactéries pathogènes.....	38
2.1.Observation macroscopique.....	38
2.2.Observation microscopique.....	39
2.3.Identification Biochimiques.....	41
II. L'antibiogramme	48
III. Isolement des bactéries lactiques	55
1. Isolement	55
2. Identification des bactéries lactiques isolées.....	56
2.1.Aspect macroscopique.....	56
2.2.Aspect microscopique.....	57
2.3.Caractères biochimiques.....	57
IV. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	58
1. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis une souche à Gram positif et a Gram négatif.....	61
2. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis les bactéries sensibles.....	63
3. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis les souches résistantes.....	64
4. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis une souche sensible et souche résistante.....	66
CONCLUSION	68

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LES ANNEXES

RESUME

Introduction

INTRODUCTION

L'infection microbienne occupe actuellement la première place dans les pathologies médicales. Elle est connue depuis longtemps, et depuis l'utilisation des antibiotiques, elle a progressivement changé de visage et les cliniciens ont été confrontés à des infections à germes autrefois réputés non pathogènes ou saprophytes. **(Nouri et Ziadi, 2015)**

L'utilisation thérapeutique d'antibiotiques a conduit à l'émergence rapide de souches bactériennes multirésistantes **(Guillot, 1989)** menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientées vers la recherche de substances naturelles entre autres les bactériocines des bactéries lactiques **(Mehidi, 2015)**.

Les bactéries lactiques représentent un groupe diversifié de bactéries dont le produit majeur de fermentation est l'acide lactique **(Boukefoussa, 2012)**. Les études de **Makras et al., (2006)**, ont déjà confirmé l'activité antagoniste des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes comme la *Salmonella*, le *Staphylococcus aureus* et le *E. coli*. Les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques dépendent de plusieurs critères : le pH, le milieu de croissance et la production de substances antibactériennes comme les bactériocines, les acides organiques, les acides gras et le peroxyde d'hydrogène **(Huttunen et al., 1995)**.

L'intérêt des bactériocines et les autres substances des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Tous ces critères suggèrent que peuvent être un substituant idéal de lutte contre les infections microbiennes **(Mehidi, 2015)**.

L'objectif principal de la recherche présentée dans ce mémoire, a été de trouver des souches lactiques qui sont capables de démontrer une activité antibactérienne envers les bactéries pathogènes sensible et résistantes aux antibiotiques.

Pour ce faire et afin de cerner le contexte de cette étude, une synthèse bibliographique relative au sujet est confectionnée donnant un aperçu sur les bactéries lactiques et leur

INTRODUCTION

antagonisme, la méthodologie adoptée dans cette étude sera détaillée suivie des résultats obtenus étayés par une discussion.

Les souches pathogènes utilisées dans cette étude provenaient de 2 sources. Une source provient de la collection de Mm T.Benbara (département microbiologie). La deuxième source provient de la collection de différents patients infectés par des bactéries résistantes aux antibiotiques, au niveau de l'hôpital Amar Ouamrane de Lakhdaria.

Les souches lactiques ayant l'activité antibactérienne proviennent de notre collection à partir de la matière fécale.

Etude bibliographique

Chapitre I
La résistance
bactérienne
aux
antibiotiques

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

1. Les antibiotiques

1.1. Historique

En 1876, Tyndall constate que des cultures renfermant plusieurs espèces microbiennes évoluent en se simplifiant : certaines espèces disparaissent, Un champignon se développe souvent : c'est un pénicillium. La même observation est faite l'année suivante par Pasteur qui écrit : "Ces phénomènes d'antagonisme autorisent peut-être les plus grands espoirs au point de vue thérapeutique." (Klein, 2014).

Le terme antibiose a été créé en 1889 par Vuillemin pour désigner les phénomènes d'antagonismes entre organismes vivants par opposition à symbiose.

En 1929, Fleming remarque que les staphylocoquesensemencés sur une boîte de Petri disparaissent sous l'action d'une moisissure, *Penicillium notatum*. Il le cultive et constate que le filtrat de culture est antagoniste de nombreuses espèces bactériennes surtout Gram +. Il donne le nom de "pénicilline" à cette substance antibiotique mais toutes ses tentatives pour concentrer et purifier cette substance seront des échecs. En effet, la molécule de pénicilline est fragile et Fleming aurait dû collaborer avec des biochimistes, spécialistes de l'extraction (Ndeli, 2009).

En 1929, Dubos, étudie la microflore du sol et fait une constatation intéressante : le sol comporte peu de germes pathogènes qu'on y déverse pourtant en quantité. Dubos montre la présence dans le sol de microorganismes producteurs d'antibiotiques comme la Tyrothricine, isolée du *Bacillus brevis* (Klein, 2014).

C'est Waksman qui à partir de 1942 a développé l'usage de nom antibiotique, l'antibiose étant un cas particulier de l'antagonisme : effet produit par voie chimique par l'intermédiaire de substances antibiotiques (Ndeli, 2009).

1.2. Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisé chimiquement capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres microorganismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe. (Gogny et al., 2001 ; Morin et al., 2005)

Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman et al., 2003 ; Singh et Barrett, 2006).

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes (Elodie, 2010).

1.3. Nomenclature

Le nom d'un antibiotique est d'origine variée, Il peut venir :

- Du nom du microorganisme producteur : pénicilline de *Penicillium notatum*
- De la structure chimique : tétracycline à cause des quatre cycles de la molécule.
- Des circonstances de l'isolement : nystatine de New York State Department of Public Health, nom du laboratoire où il a été isolé.

A côté de sa dénomination commune internationale (DCI) , un antibiotique peut avoir différents noms commerciaux déposés par différents laboratoires de l'industrie pharmaceutique (Ben Moussa, 2016).

1.4. Classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Tout en adoptant la classification des antibiotiques en grandes familles ; pour chaque famille les molécules ont une structure de base commune et le même mécanisme d'action ; une famille peut être divisée en groupes et/ou sous-groupes qui ont des spectres d'activité qui diffèrent (Hnich, 2017).

1.5. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques présentent deux grands modes de fonctionnement. Certains attaquent le peptidoglycane de la paroi bactérienne ce qui cause une déstabilisation de la bactérie et entraîne sa mort. Il s'agit de l'action **bactéricide**, autrement dit qui tue les bactéries (Battraud, 2017).

D'autres agissent sur le système protéique de la bactérie : en se fixant sur la sous-unité 50s du ribosome bactérien entraînant une inhibition de la synthèse protéique. La bactérie ne meurt pas mais ne peut plus se développer ni se multiplier, on parle de **bactériostatisme**. L'antibiotique est donc capable d'inhiber la multiplication des bactéries sans les tuer (Battraud, 2017).

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les micro-organismes selon plusieurs mécanismes dont certains sont connus :

- 1.5.1. Action sur la paroi bactérienne :** la synthèse des mucopeptides de la paroi bactérienne est perturbée par l'inhibition de certains enzymes : peptidoglycane synthétase, transpeptidase. Les antibiotiques agissent par ce mécanisme, de préférence sur les bactéries jeunes dont la paroi est en cours d'édification. Les bactéries Gram positif dont la paroi est riche en mucopeptides sont les plus sensibles (**Djemoui, 2012**).
- 1.5.2. Action sur la membrane cytoplasmique et la membrane extérieure des bactéries Gram négatif :** certains antibiotiques se fixent sur les phospholipides de la membrane cytoplasmique, entraînant une altération de la perméabilité de cette membrane. Ils opèrent comme des agents tensioactifs cationiques. Les constituants cellulaires s'échappent du cytoplasme bactérien, ce qui provoque la mort cellulaire (**Djemoui, 2012**).
- 1.5.3. Action sur la réplication de l'ADN :** certains antibiotiques comme les quinolones perturbent la réplication de l'ADN. Leur action se situe à différentes étapes de la synthèse de l'acide nucléique. Ils agissent par inhibition de l'ADN- gyrase formé de deux sous unités (gyrase A et gyrase B) et/ou de la topo- isomérase II responsable du surenroulement de l'ADN des bactéries (**Diall, 1989**).
- 1.5.4. Action sur la traduction de l'ARNm :** l'ARNm et l'ARNt sont les cibles des antibiotiques et les mécanismes de traduction de l'ARNm sont troublés, Certains antibiotiques se fixent sur la sous unité ribosomale 30 S, d'autres interviennent de diverses manières sur la sous unité ribosomale 50 S (**Djemoui, 2012**).

2. La résistance aux antibiotiques

2.1. Historique

« ... un mauvais usage de la substance aboutirait à ce que, au lieu d'éliminer l'infection, on apprenne aux microbes à résister à la pénicilline et à ce que ces microbes soient transmis d'un individu à l'autre jusqu'à ce qu'ils en atteignent un chez qui ils provoqueraient une pneumonie ou une septicémie que la pénicilline ne pourrait guérir... » (**Fleming, 1945**)

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

Dès 1940, qu'**Abraham** et **Chain** observent que des extraits de différentes bactéries sont capables de détruire la pénicilline. A cette époque la pénicilline n'avait pas encore été utilisée en thérapeutique (**Abraham et Chain, 1940**).

Les théories génétiques de l'époque, basées sur le schéma classique mutation-sélection, n'étaient pas satisfaisantes pour interpréter un tel phénomène. Ultérieurement, l'utilisation thérapeutique croissante d'antibiotiques appartenant à des familles de plus en plus nombreuses conduisit, en particulier chez les entérobactéries, à l'émergence de souches bactériennes résistant à plusieurs antibiotiques (**Hnich, 2017**).

Ce fut le cas au Japon, au début des années 50, où suite à l'introduction de la streptomycine, de la tétracycline et du chloramphénicol et à leur utilisation massive, des souches résistant à ces antibiotiques apparaissent (**Davies, 2010**).

En 1955, **Ochiai** et **Akiba** observent, lors d'une épidémie de dysenterie bacillaire, que les *Shigella* responsables, initialement sensibles, sont devenues simultanément résistantes à la streptomycine, au chloramphénicol, à la tétracycline et aux sulfamides. La survenue chez ces souches de mutations simultanées est d'une probabilité tellement infime qu'elles ne pouvaient expliquer le phénomène apparu (**El abdani, 2016**).

En 1960, **Akiba** émet alors l'hypothèse que la résistance multiple a été transférée aux *Shigella* dans l'intestin des malades par simple contact avec des *Escherichia coli* présents multirésistants. Le mélange des souches *in vitro*, suivi de l'acquisition de la résistance par les *Shigella*, permit de confirmer l'hypothèse. L'existence de bactéries multirésistantes fut aussi découverte chez les bactéries à Gram positif, notamment les staphylocoques. C'est chez les staphylocoques que l'on remarque que le traitement des bactéries avec des agents courants comme l'acriflavine pouvait entraîner l'élimination de la résistance (**Couturier et al., 1988**).

L'ensemble de ces observations de multirésistance, et de transferts, conduisit **Novick** (1963) à supposer que la résistance était associée à une structure extra-chromosomique qu'il appela plasmide (**Hnich, 2017**).

La troisième étape historiquement importante fut, en 1974, la découverte par **Hedges** et **Jacob** que des gènes de résistance situés sur des plasmides étaient transposables. Le premier transposon portant un gène de résistance codait pour la résistance à l'ampicilline (Tnl).

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

Depuis cette date, il est apparu que la plupart des gènes de résistance pouvaient se transposer (Levy, 1982). Ces transposons sont largement distribués sur des plasmides différents et des espèces bactériennes distinctes (Guillot, 1989).

2.2. Définition

La résistance bactérienne est retenue lorsqu'un antibiotique perd sa capacité à inhiber efficacement la croissance bactérienne. Autrement dit, les bactéries continuent de se multiplier en présence de concentrations thérapeutiques d'antibiotiques (Hnich, 2017).

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Guillot, 1989).

2.3. Les phénotypes de la résistance bactérienne

La lecture de l'antibiogramme permet d'obtenir l'expression phénotypique, c'est-à-dire de déterminer la sensibilité de la souche vis-à-vis d'un nombre déterminé d'antibiotique (El abdani, 2016).

Si la souche n'exprime que des résistances naturelles, on dit qu'elle appartient au phénotype "sauvage" ou sensible. Si elle exprime un phénotype acquis de résistance identifiable on doit tenter d'en déterminer le mécanisme (Lagha, 2015).

Ces phénotypes sont souvent désignés par les initiales des antibiotiques devenus inactifs : ainsi une souche résistante à la kanamycine, à la tobramycine et à la gentamicine appartient au phénotype KTG (El abdani, 2016).

2.4. Types de résistance aux antibiotiques

La progression de la résistance bactérienne aux antibiotiques cause des infections difficiles à traiter et pose un problème de santé publique. Les bactéries résistantes sont souvent la cause des infections nosocomiales aggravant le pronostic des malades, prolongent leur hospitalisation et augmentent les coûts de traitement. On distingue deux types de résistance bactérienne. La résistance naturelle et la résistance acquise (Meskine et Benabdelkader, 2016).

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

2.4.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce (**Lagha, 2015**).

Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactives vis à vis de ces bactéries (**Meskiné et Benabdelkader, 2016**).

La résistance est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Elle est programmée sur le génome bactérien. Les bactéries naturellement sensibles définissent le « spectre d'activité » de l'antibiotique (**Nouri et Ziadi, 2015**).

2.4.2. Résistance acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique (**Meskiné et Benabdelkader, 2016**).

Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérienne, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif ou de transposons (**Nouri et Ziadi, 2015**).

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

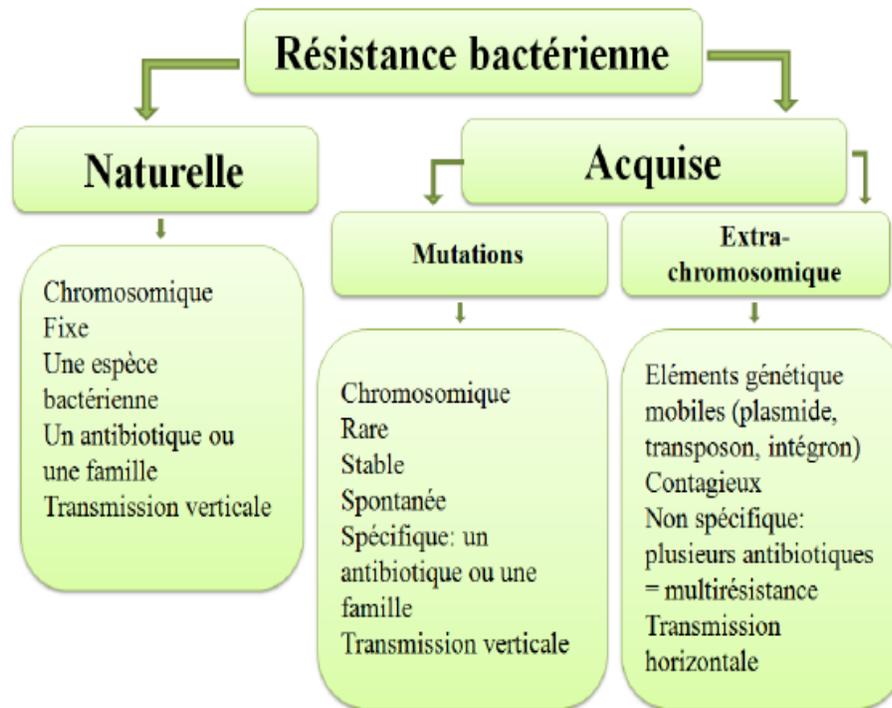


Figure 01: Les deux types de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Azmoun, 2016)

2.5. Les Mécanismes de la résistance acquise

2.5.1. Les mécanismes génétiques

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique (Bogdan, 2008).

2.5.1. a- La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard. Il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique. Mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique). Elle est transmissible ; elle est permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles) (Mansonet *al.*, 2010).

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

2.5.1. b- La résistance extra-chromosomique (plasmides)

Deux faits expliquent l'importance de la résistance plasmidique :

- La résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie.
- De nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal ; ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de "contagieuse ou d'infectieuse" (**Mansonet *al.*, 2010**).

2.5.2. Mécanismes biochimiques

Les mécanismes biochimiques de la résistance acquise peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes

2.5.2. a- Diminution de la perméabilité et efflux actif

La diminution de la perméabilité est liée à des mutations affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie ; l'efflux repose sur une pompe insérée dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal. Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (**Pagès, 2004**).

2.5.2. b- Modification de la cible des antibiotiques

Ex : modification des PLP : les PLP ou "protéines liant les pénicillines" sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane (paroi bactérienne) et qui sont la cible des bêtalactamines (en se fixant aux PLP les bêtalactamines les empêchent de jouer leur rôle ; la synthèse du peptidoglycane est donc entravée). Trois mécanismes peuvent intervenir :

- Diminution de l'affinité des PLP pour les bêtalactamines (ex: *Streptococcus pneumoniae*; les bêtalactamines ont du mal à se fixer aux PLP qui restent disponibles pour la synthèse du peptidoglycane) (**Bilman et Turhanoğlu, 2016**).
- Augmentation de la synthèse des PLP existantes avec hyper-expression de PLP possédant naturellement une faible affinité pour les bêtalactamines (**Bilman et Turhanoğlu, 2016**).
- Synthèse d'une ou de plusieurs nouvelles PLP insensibles aux bêtalactamines Ex : *Staphylococcus aureus* : l'acquisition et l'intégration dans le chromosome d'un gène

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

(*mecA*), d'origine mal connue, induit la synthèse d'une nouvelle PLP, la PLP 2a qui est capable d'assurer à elle seule l'assemblage du peptidoglycane et elle confère une résistance à toutes les bêtalactamines (Voillot, 2018).

2.5.2. c- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques

Ex : production de bêta-lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables. Le nombre des bêta-lactamases plasmidique est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les bêtalactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tel que l'acide clavulanique, les bêta-lactamases peuvent être regroupées en 4 catégories :

- **Les pénicillinases *sensu stricto* chez *Staphylococcus aureus***, elles inactivent la pénicilline G, les pénicillines A, elles sont par contre sans action sur la pénicilline M (oxacilline ou méticilline) ainsi que sur les céphalosporines. Ces pénicillinases sont inductibles et codées par des plasmides ou des transposons (Voillot, 2018).
- **Les bêta-lactamases à spectre élargi**, ces bêta-lactamases codées par des plasmides entraînent une résistance (ou une diminution d'activité) vis-à-vis des pénicillines G, des pénicillines M, des carboxypénicillines, des uréidopénicillines, des céphalosporines de 1ère et de 2ème génération (sauf les céphamycines) ; les bêtalactamases à spectre élargi sont bien inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam (Lozniewski et al., 2010).
- **Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)**, ces bêta-lactamases dérivent des enzymes précédentes par mutation des gènes codant pour les bêta-lactamases à spectre élargi. Le profil de résistance conféré est identique à celui conféré par les bêta-lactamases à spectre élargi mais, il s'étend aux céphalosporines de 3^{ème} génération et à l'aztréonam. Les bêta-lactamases à spectre étendu restent sensibles aux inhibiteurs (Voillot, 2018).
- **Les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs**, les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs dérivent de certaines bêta-lactamases à spectre élargi par mutations ponctuelles. Le profil de résistance conféré est identique à celui des bêta-lactamases à spectre élargi mais ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam (Lozniewski et al., 2010).

Chapitre I : La résistance Bactérienne aux Antibiotiques

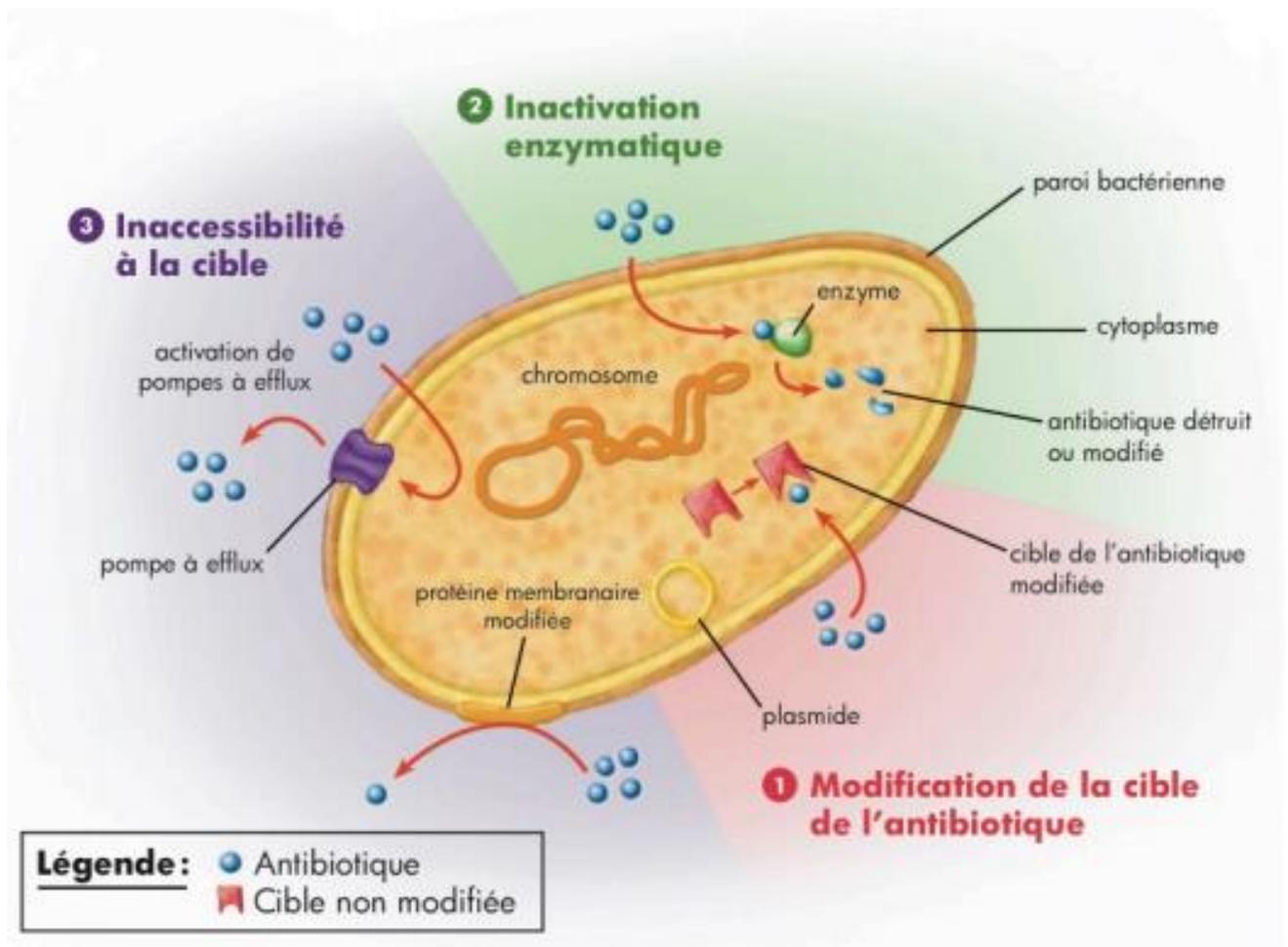


Figure 02 : Principaux mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Coustès, 2016).

Chapitre II
L'activité
antibactérienne
des bactéries
lactiques

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

1. Généralité sur les bactéries lactiques

1.1. Historique et généralités

Le groupe des bactéries lactiques défini pour la première fois par **Orla Jensen (1919)** ayant le statut GRAS (Generally Recognized As Safe), il présente un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. (**Adams, 1988**).

Leur métabolisme est strictement fermentaire, elles fermentent le lactose en acide lactique et selon le produit final de cette fermentation lactique, elles sont dites homolactiques si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactiques si d'autres composés sont aussi présents comme l'acide acétique, éthanol et CO₂ (**Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005**).

Les bactéries lactiques sont Gram positif, sous formes de coques ou de bacilles généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative, généralement nitrate réductase négative, et ce sont des bactéries anaérobies facultatives. En outre, elles ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles, certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes, elles se développent majoritairement à pH 4,0- 4,5 et certaines peuvent pousser à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis à vis du sel (**Caplice et Fitzgerald, 1999**). Les bactéries lactiques possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytiques et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994**).

1.2. Ecologie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, elles peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique (**Dellaglio et al., 1994**).

Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux et peuvent aussi coloniser le tube digestif de l'homme et des animaux (**Leveau et Bouix, 1993**).

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

1.3. Taxonomie

La taxonomie des bactéries lactiques ne cesse d'évoluer depuis leur description par **Orla Jensen en 1919**, où il a décrit une première classification selon le métabolisme fermentaire des carbohydrates, ce qui a permis de les classer en deux groupes selon le type de la fermentation lactique : Le groupe homofermentaire, et hétérofermentaire (**Dellaglio et al., 1994**).

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaitre douze genres : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

Elle se base sur des données de séquençage de 16S et 23S de l'ADNr, les bactéries Gram positives forment deux embranchements, un embranchement composé de bactéries Gram positives avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycètes) (**Holzapfel et al., 2001**).

Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (**Vandamme et al., 1996**). (Figure 01)

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

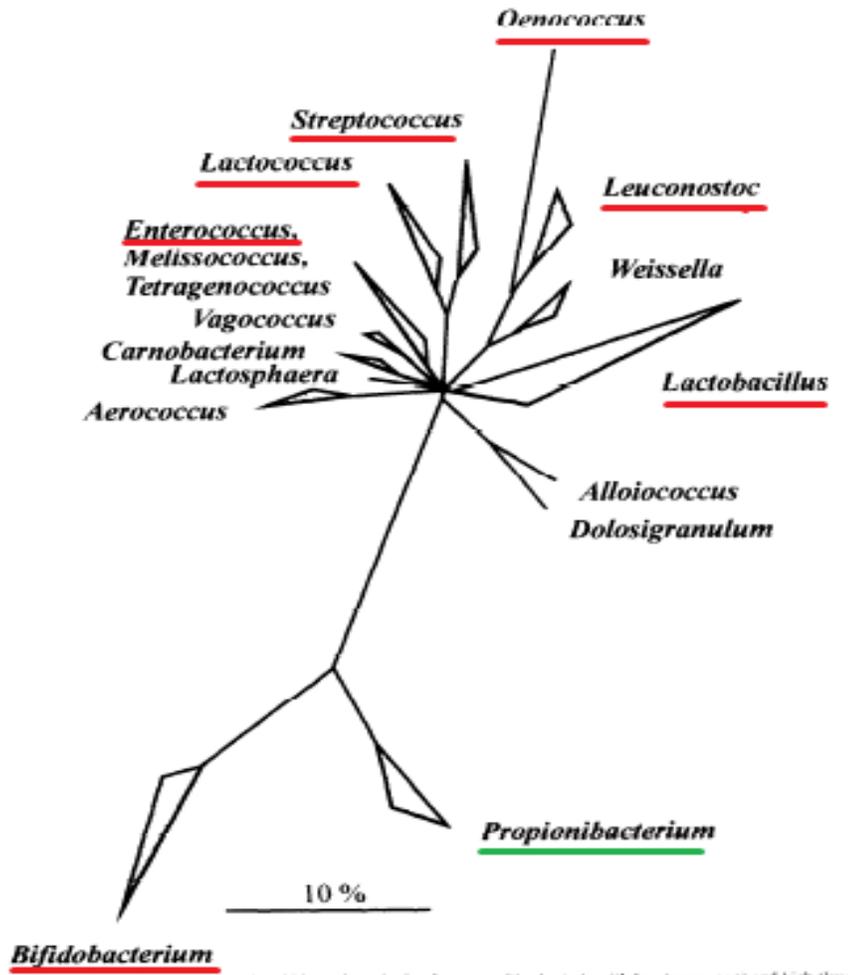


Figure 03 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (Vandamme et al., 1996).

1.4. Les genres des bactéries lactiques

1.4.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C (Khalid et Marth, 1990).

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990).

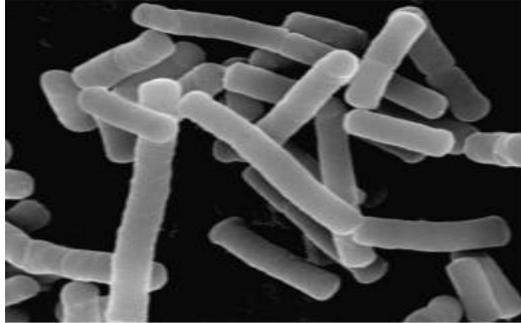


Figure 04 : Observation au microscope électronique à transmission de *Lactobacillus sp* (GX10000) (Boumediene, 2013)

1.4.2. *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+), seul *Lactococcus lactis sp. Lactis biovar. Diacety lactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

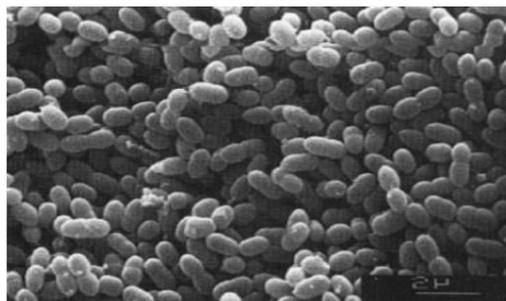


Figure 05 : Observation au microscope électronique à balayage de *Lactococcus lactis* (GX10000) (Teuber et Geis, 1989)

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

1.4.3. *Streptococcus*

Les membres du genre *Streptococcus* sont Gram positif, catalase négative, anaérobie facultatif ont la forme sphérique ou ovoïde, moins de 2µm de diamètre et un faible contenu en G + C. Les streptocoques ne sont pas mobiles et ne forment pas de spores (**Whiley et Hardie, 2009**).

La température optimale de croissance est habituellement d'environ 37°C, mais des températures de croissance minimales et maximales peuvent varier entre les espèces. Beaucoup d'entre elles sont commensales de l'homme et les animaux, et certaines sont hautement pathogènes (**Whiley et Hardie, 2009**).

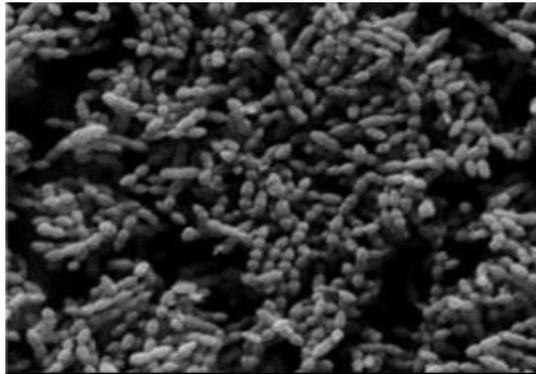


Figure 06 : Observation au microscope électronique à balayage de *Streptococcus thermophilus* (GX7000) (**Vendramin et al., 2017**)

1.4.4. *Enterococcus*

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif se présentant isolées, en paires, en chaînes courtes ou elles peuvent être disposées en groupes en particulier si la morphologie des cellules est étudiée à partir des cultures cultivées sur un support solide. Les cellules sont souvent allongées dans la direction de la chaîne. Les entérocoques peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maturation et le développement de l'arôme de certains produits alimentaires traditionnellement fermentés tels que les fromages et la charcuterie. Elles sont également utilisées comme probiotiques humains, pour traiter les maladies diarrhéiques causées par des pathogènes d'origine alimentaire (**Svec et Franz, 2014**).

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

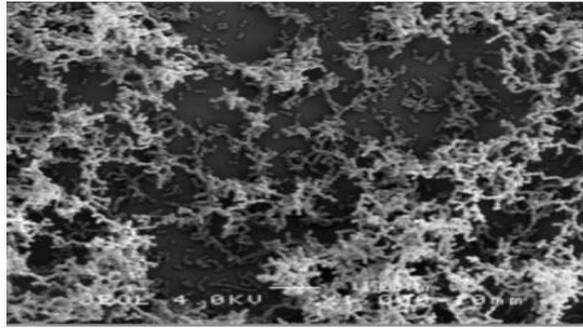


Figure 07 : Observation au microscope électronique *Enterococcus faecium* (GX4000) (Kokkinos et al., 1989)

1.4.5. *Pediococcus*

Les pédiocoques sont des bactéries à Gram positif, oxydase-négatives et catalase négative. Elles sont immobiles, se révèlent autant que cellules sphériques d'une taille uniforme et se disposent comme tétrades par autre division perpendiculaire en deux directions (Gunther et Blanc, 1961).

Les espèces *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus* et *P. inopinatus* sont des cultures starters importants dans la production de plusieurs produits à travers le monde (Svec et Franz, 2014).

P. pentosaceus peut jouer un rôle dans la fermentation et la maturation du fromage (Callon et al., 2004). Un certain nombre de bactériocines (pediocines) a été décrit pour *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* (Todorov et Dicks, 2005).

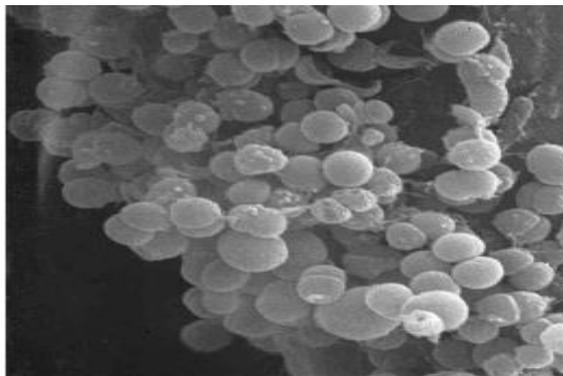


Figure 08 : Observation au microscope électronique à balayage de *Pediococcus acidilactici* (GX10000) (Cho et al., 1996)

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

1.4.6. *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont des anaérobies mais quelques espèces tolèrent l'Oxygène dans la présence ou non du CO₂. Ces dernières sont dépourvues de la catalase, le contenu en G + C est de 61% (Mattarelli et Biavati, 2014). Elles sont des bactéries commensales de l'homme, elles sont retrouvées également chez les animaux (Biavati et al., 2000). Les conditions optimales de croissance des bifidobactéries d'origines humaine se situent à des températures comprises entre 37°C et 41°C, et des valeurs de pH entre 6,5 et 7 (Hadadji, 2007). A l'heure actuelle les bifidobactéries sont les fameuses bactéries utilisées autant que probiotiques, à travers divers produits comme par exemple : les laits fermentés, des fromages...etc.

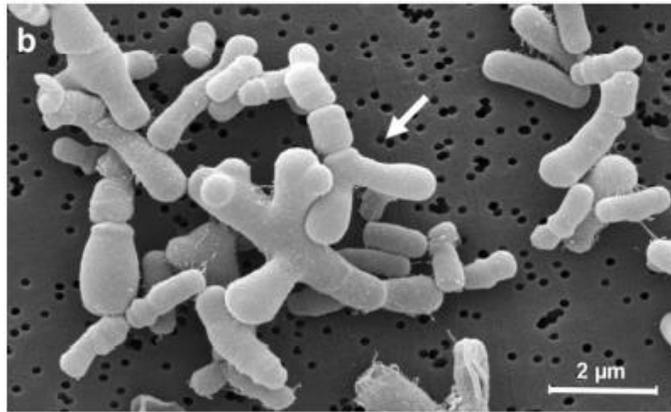


Figure 09 : Observation au microscope électronique à balayage de *Bifidobacterium animalis* (GX10000) (Vinderola et al., 2012)

Le tableau représentatif de différentes bactéries lactiques mentionnées dans (Annexe 3)

2. L'activité antibactérienne des bactéries lactiques

2.1. Les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques

On reconnaît depuis longtemps aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autres acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, reutériène et les bactériocines (Beneddine et Djebrit, 2015).

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

2.2. Synthèse de métabolites antimicrobiens

2.2.1. Les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques qui sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique, formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (Liu, 2003). Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe (Belarbi, 2011).

Les bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés «acid tolerance response» vis-à-vis de l'exposition à des pH acides. Ceux-ci leur sont également utiles pour survivre au transit intestinal (Cotter et Hill, 2003).

2.2.2. Acides gras

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté et des saucisses sèches (Belaidouni, 2017).

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (Noura et Ghoul, 2017).

2.2.3. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont catalase négative et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) essentiellement par le métabolisme aérobie ou en microaérobiose des glucides. Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. Il peut

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Belarbi, 2011**).

Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui est parfois décrit comme étant des pseudocatalases (**Strus et al., 2005**).

Son action se manifesterait aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (**Zalan et al., 2005**).

2.2.4. Le dioxyde de carbone

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

2.2.5. Le diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Lactobacillus sp* et *Pediococcus sp*. Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatifs et les bactéries Gram positifs non lactiques, ces dernières sont néanmoins moins sensibles (**Benmeziiane et Bennai, 2016**).

Cependant, les concentrations nécessaires pour avoir une inhibition sont très supérieures à celles rencontrées dans les aliments (100 ppm pour les *Pseudomonas* qui sont les germes les plus sensibles) (**Guetarni, 2007; Menad, 2017**).

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

2.2.6. La reutérine

Axelsson et al., (1989) ont mis en évidence l'action inhibitrice d'une substance produite par *Lactobacillus reuteri*. Cette substance (reutérine) a été purifiée et identifiée (**Belarbi, 2011**).

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* (**El Ziney et al., 1998**).

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

2.2.7. Les bactériocines

2.2.7. a- Définition

Les bactériocines sont des peptides extracellulaires, thermostables, synthétisés par voie ribosomique doués d'une activité bactéricide ou bactériostatique contre les espèces proches (spectre étroit) ou d'autres genres (spectre large) et à laquelle la cellule productrice dispose d'un mécanisme d'immunité spécifique (**Cotter et al., 2005**).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (**Mehidi, 2015**).

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**Menad, 2017**).

2.2.7. b- La nature

Les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique.

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

Certaines d'entre elles renferment des acides aminés inhabituels tels la lanthionine et la β -méthylelanthionine (Mehidi, 2015).

2.2.7. c- Les classes des bactériocines

Tableau 01: Classification des bactériocines des bactéries lactiques (Cotter et al., 2005)

Classe	Description et sous-classes	Exemples
Classe I L'antibiotique	Renferme les lantibiotiques à un et deux peptides 11 sous-classes décrites	- à un seul peptide : Nisine, Lacticine 481, Mersacidine - à deux -peptides: Cytolysine, Lacticine 3147
Classe II Bactériocines non modifiées	Classe hétérogène formée de petits peptides - sous-classe a : bactériocines semblables à la pédiocine (pediocin-like). - sous-classe b : bactériocines à deux peptides - sous-classe c : bactériocines cycliques. - sous-classe d : bactériocines à un seul peptide linéaire autre que la pédiocine.	Pédiocine PA1, Leucocine A Lactacine F Enterocine AS48, Reutéline 6 Lactococcine A, Divergicine A
Classe III Bactériolysines Protéines lytiques non considérées comme bactériocine	Grosses protéines thermolabiles généralement des hydrolases de muréine.	Lysostaphine, Enterolysine A

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

2.2.7. d- Production des bactériocines

Les bactériocines sont produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne, L'expression de gènes localisés soit sur le chromosome, comme c'est le cas de la mersacidine, soit sur un plasmide, comme c'est le cas de la sakacine A, ou sur un transposon, comme c'est le cas de la nisine (**Benmammar, 2018**).

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée. (**Carine et Philippe, 2009**)

2.2.7. e- Mode d'action

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (**Mehidi, 2015**). (**Figure10**)

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (**Carine et Philippe, 2009**).

L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure α -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisations de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire (**Ababsa, 2012**).

Les bactériolysines par ailleurs ont un mode d'action complètement différent basé sur l'hydrolyse des liaisons peptidiques des peptidoglycanes (**Nilsen et al., 2003**).

Chapitre II : L'activité Antibactérienne des Bactéries Lactiques

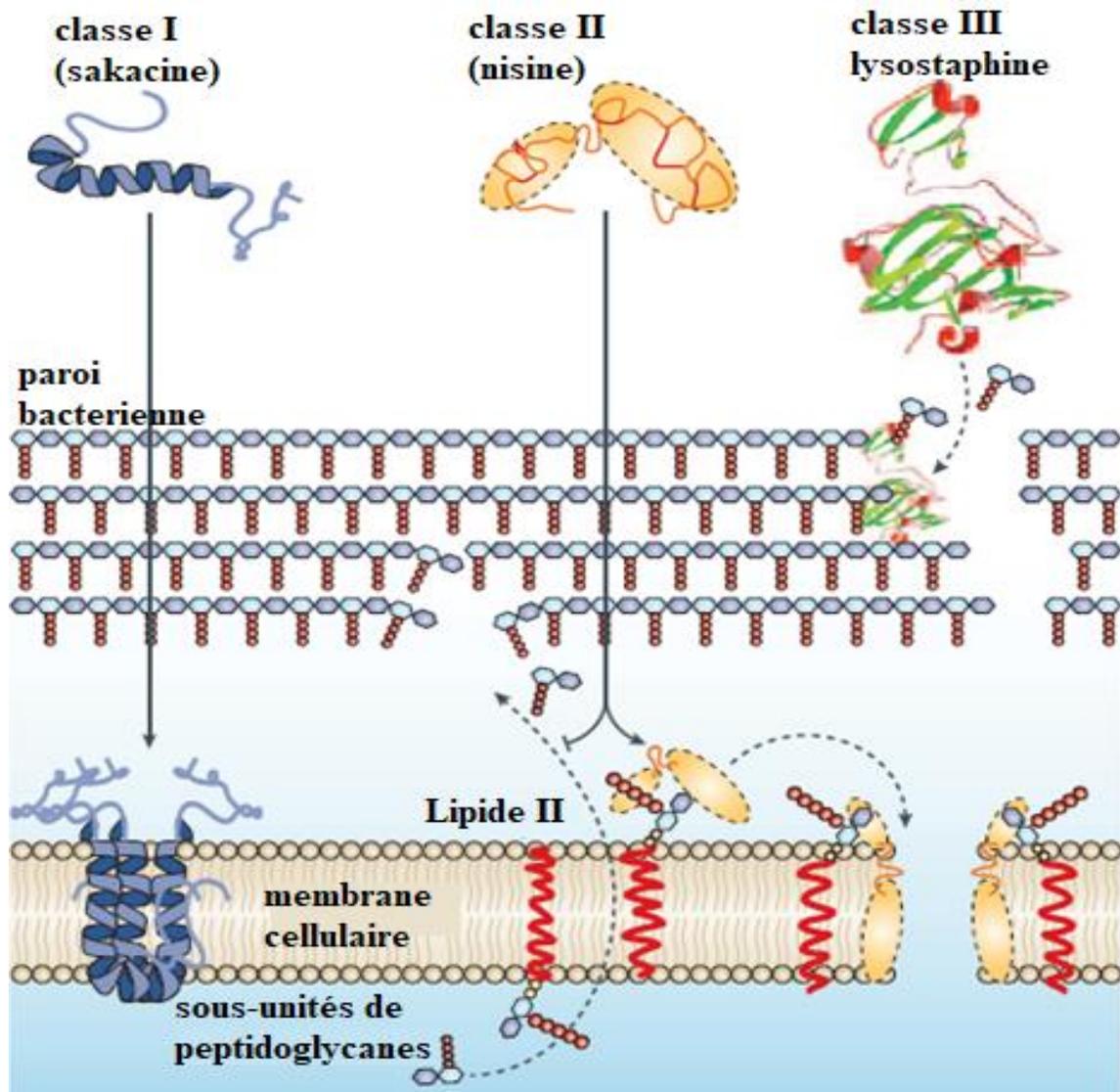


Figure 10 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter *et al.*, 2005).

Etude expérimentale

Matériels et méthodes

I. Lieu de stage

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Amar Ouamrane de Lakhdaria, au niveau de wilaya de Bouira, durant la période de juillet 2018 jusqu'au mois d'avril 2019.

II. Isolement des bactéries pathogènes

1. Echantillonnage

Sept échantillons de pue et d'urines ont été récoltés dans l'hôpital Amar Ouamrane de lakhdaria par différentes manières et transportés immédiatement au laboratoire pour l'analyse. Le tableau au-dessous récapitule la nature, la source, le type de prélèvement des échantillons avec d'autres informations.

Tableau 02 : Origine de diffèrent prélèvements effectués.

Echantillon	Origine	Type de prélèvement	Date	Service	Age	Sexe	Maladie
E1	Sonde urinaire	Récolte urinaire	12.07.2018	Maternité	35 ans	Femme	Césarisée
E2	Urines	Récolte urinaire	14.07.2018	Personnel homme	30 ans	homme	Infection
E3	Plaie infectée	Écouvillonnage	16.07.2018	Salle de Changement de pansements	42 ans	Femme	Infection
E4	LCR	Ponction lombaire	22.07.2018	Pédiatrie	3mois	Fille	Méningite bactérien
E5	Urines	Récolte urinaire	17.01.2019	Personnel femme	40ans	Femme	Infection urinaire
E6	pue	Écouvillonnage	16.04.2019	chirurgie	27 ans	Femme	Infection
E7	Urines	Récolte urinaire	27.04.2019	Personnel homme	50 ans	Homme	Infection urinaire

Sept autres bactéries de type *Escherichia coli* sensible sont été isolées par Mm Benbara (département microbiologie. Université de Béjaia).

2. Isolement des bactéries pathogènes

L'isolement des souches bactériennes a été effectué sur différent milieux de culture à savoir la gélose Chapman pour *Staphylococcus aureus*, gélose nutritive pour *Klebsiella pneumoniae*, Hektoen pour *Pseudomonas aeruginosa* et gélose EMB pour *Escherichia coli*. Les

boites ont été ensuite incubées pendant 24 h à 37°C. La purification des souches obtenues est effectuée par un repiquage successif sur les mêmes milieux de culture.

2.1. *Escherichia coli*

L'isolement d'*E. coli* a été effectué à partir des urines d'un patient, Deux gouttes des urines ont étéensemencées sur une gélose Hektoen et gélose EMB pour la recherche d'*E. coli*, l'ensemencement a été faite par la méthode en quadrant.

Ce mode d'ensemencement permet d'isoler les différentes bactéries contenues dans un mélange. Le dépôt de l'échantillon ou de la suspension de germe est effectué près de bord de la boîte de Petri, ou une strie dans un quart de la boîte qui constituera le premier quadrant. Un isolement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée à usage unique ou d'une anse en platine (réutilisable).

2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus a été isolé à partir d'une plaie infectée en utilisant un écouvillon stérile, la technique d'écouvillonnage utilisé a été comme suite :

- Rinçage abondant et profond de la plaie avec une solution saline physiologique stérile (et non une solution antiseptique).
- Prendre l'échantillon sur la plaie en tournant le bout ouaté du coton-tige sur lui-même, avec une rotation de 360° et en couvrant seulement une surface de 1 cm².
- Appliquer une pression suffisante, pendant 5 secondes, pour extraire de l'exsudat du lit de la plaie (et non à la surface des tissus).
- Réintroduire le coton-tige dans l'écouvillon et fermer le capuchon.

L'écouvillon a été transporté au laboratoire et mis dans un milieu BGT, le milieu a été incubé pendant 24h à 37°C, après 24h une suspension a étéensemencé sur gélose Chapman par une pipette Pasteur et incubée pendant 24h à 37°C.

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa a été isolé à partir d'une sonde urinaire d'une femme césarisée par écouvillonnage, la technique utilisé a été comme suite :

- Prendre la sonde urinaire et le vider d'urines.
- Dévisser le bouchon pour sortir l'écouvillon du tube.

- Ecouvillonner la surface sur un carré de 10 cm de côté en inversant les sens d'écouvillonnage (horizontal, vertical, diagonal).
- Remettre l'écouvillon dans le tube, revisser le bouchon : l'échantillon est prêt pour l'analyse.

Une fois l'écouvillon a été transporté au laboratoire, il a été mis dans un milieu BGT pour enrichir la suspension bactérienne prélevée, le milieu a été par la suite incubé à 37°C pendant 24h, après 24h la suspension a été ensemencée sur gélose Hektoen et incubé 24h à 37°C.

2.4. *Klebsiella pneumoniae*

L'isolement de *Klebsiella pneumoniae* a été effectué à partir des urines d'un patient. Deux gouttes des urines ont été ensemencées sur une gélose nutritive, l'ensemencement a été fait par la méthode de quadrant.

3. Identification des souches

L'identification des souches purifiées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) est réalisée en suivant une procédure de plusieurs étapes successives, basée sur la recherche et la détermination d'un certain nombre de caractères morphologiques (coloration de Gram), et des caractères biochimiques.

3.1. Etude macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation macroscopique des colonies directe à l'œil nu ou par une loupe binoculaire. Elle permet de décrire la taille, l'aspect, la couleur, la consistance, le contour, l'opacité, et la forme des colonies.

3.2. Etude microscopique

Ce test a pour but de déterminer le type de la paroi bactérienne à Gram positif ou Gram négatif après coloration de Gram, il sert à colorer les bactéries Gram négatif en rose et les Gram positif en violet. Les étapes sont mentionnées dans la figure (**l'annexe 4**).

3.3. Identification biochimique

L'identification biochimique des 14 souches a porté sur une série de tests biochimiques (galerie classique).

Tableau 03 : Galerie biochimique classique d'identification des souches.

Milieu	Mode d'ensemencement	Caractère recherchés	Résultats
Milieu TSI	-Ensemencement de la pente de la gélose par des stries serrées, puis le culot par piqûre centrale et l'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. -Le bouchon de milieu ne doit pas être trop vissé.	-Lactose. -Glucose. -saccharose. -Gaz. -Production d'H2S.	Lactose + Saccharose + Glucose + virage de culot au jaune. Gaz + : apparition des bulles ou des poches gazeuses qui décalent la gélose de fond de tube. Production d'H2S : Noircissement du milieu.
Mannitol-mobilité	Ensemencement par piqûre centrale à partir de la suspension bactérienne, dans le culot jusqu'au fond du tube. Incubation dure 24 heures à 37°C.	-Fermentation du mannitol. -La mobilité.	Mannitol+ : Coloration jaune du milieu. Mobilité+ : apparition de la diffusion des bactéries dans la gélose de part est d'autre de la piqûre centrale.
(Disques ONPG)	Ensemencement d'une suspension dense des bactéries dans l'eau distillée Ajouté un disque imprégné d'ONPG, l'incubation à 37°C/24h.	La présence d'une bêta-galactosidase	ONPG + : apparition de couleur jaune qui
Urée-indole	Ensemencement des colonies dans un 1ml du milieu, l'incubation à 37°C/24h.	-Uréase. -Indole.	Uréase+ : Virage du milieu au rouge/ rose. Indole+ : Apparition d'un anneau rouge en surface après l'ajout de quelques gouttes de réactif de kovacs

Recherche des décarboxylases : LDC, ODC, ADH	Ce test consiste à verser dans des tubes stériles de milieu Moeller (3 Tubes des acides aminés et un autre témoin) , ensemencé les milieux par une colonie et les recouvrir par l'huile de vaseline stérile afin de créer une anaérobiose relative. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.	-L'utilisation des acides aminés	LDC, ODC, ADH : après l'acidification du milieu, la présence de décarboxylase induit à la réalcalinisations du milieu donc le milieu revient à sa couleur initiale.
Clark et Lubs (RM et VP)	Ensemencement du milieu par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne dans deux tubes contenant chacun 0,5 ml de milieu Clark et Lubs, puis incubé à 37°C pendant 24h.	-Type fermentaire.	VP + : virage au rouge cerise après l'ajout des réactifs VP I et VP II. RM + : Coloration rouge après l'ajout de réactif RM
Utilisation de citrate	Ensemencement de la pente de la gélose par des stries longitudinales et l'incubation est réalisé à 37°C pendant 24h.	-Utilisation de citrate.	Citrate + : virage de milieu au bleu et une culture de colonie sur la pente.
Recherche de la catalase	On prend une goutte d'eau oxygénée (H ₂ O ₂) à 10 volumes qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune	Présence de l'enzyme catalase	Catalase + : dégagement gazeux abondant sous forme de mousse
Test de la coagulase	des colonies isolées de <i>Staphylococcus</i> dans un microtube stérile contenant 0.5 ml de plasma citraté. Le mélange est ensuite incubé à 37°C et examiné après chaque 4 h.	Présence de l'enzyme coagulase	Coagulase + : la formation d'un coagulum.
Test d'oxydase	Ce test est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif sur lequel nous avons déposé une colonie.	Présence de l'enzyme oxydase	Oxydase + : l'apparition d'une coloration violette

4. Antibiogramme des souches isolées

Ce test permet de mettre en évidence la résistance des bactéries vis à vis de différents antibiotiques. L'antibiogramme des souches isolées a été effectué par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton à partir des disques d'antibiotiques selon les normes préconisées par la fiche HiMedia de l'hôpital de Lakhdaria, et le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (HiMedia, 2019; CASFM-EUCAST, 2018).



Figure 11 : Les disques d'antibiotiques.

Une colonie de chaque bactérie testée a été prélevée et dissoute dans 9 ml d'eau distillée stérile. Nous avons mélangé notre inoculum pour avoir une suspension homogène. Ensuite nous avons placé 2 à 3 gouttes de cette suspension à l'aide de la même pipette dans un autre tube contenant 9ml d'eau distillée stérile en formant une deuxième suspension moins chargée par la bactérie (dilution de 1/100). C'est cette dernière suspension qui nous a servi d'inoculum pour notre antibiogramme.

L'ensemencement a été fait par inondation en versant $\frac{1}{2}$ de la suspension diluée (1/100) sur le milieu Muller Hinton, l'excès de l'inoculum est éliminé. Les boîtes de Petri sont mises dans une étuve pendant 3 à 4 minutes afin de fixer la suspension sur la gélose.

Les disques d'antibiotiques « contenu dans les cartouches » sont déposés sur les boîtes MH préalablement séchées, à l'aide d'une pince flambée et refroidie, tout en respectant la distance de 2 à 2,5 cm entre les disques et 1 cm du bord de la boîte.

La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Les souches ont été classées en catégorie sensible (S) ou résistante (R) selon les valeurs interprétatives de l'antibiogramme. Les antibiotiques testés pour chaque bactérie sont listés dans les tableaux (**Annexe 3**).

III. Isolement des bactéries lactiques

1. Echantillonnage

La niche écologique utilisée pour l'isolement des bactéries lactiques est les selles d'enfants âgés de 4 jours à 2 ans. L'étude a été conduite sur 29 échantillons collectés dans la région de lakhdaria. Les échantillons des selles d'enfants ont été collectés dans des pots propres et stériles et acheminés au laboratoire pour être analysés le jour même (**tableau 03**).

Tableau 04 : Présentation des échantillons des bactéries lactiques.

Echantillon	Date de prélèvement	Etat sanitaire	Région	Sexe	L'âge	Aspect des selles
E4	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	10 jours	Homogène et jaunâtre
E5	03.07.2018	Sain	Kadiria	Fille	2 ans	Homogène et verdâtre
E6	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	1 mois et 8 jours	Homogène et jaune verdâtre
E8	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	5 mois	Homogène et jaune verdâtre
E10	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	7 jours	Homogène et jaunâtre
E11	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	4 mois	Homogène et jaune verdâtre
E12	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	4 mois	Homogène et verdâtre
E13	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	13 jours	Homogène et jaunâtre
E14	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	2 mois	Homogène et jaune verdâtre
E15	31.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	6 jours	Homogène et jaunâtre

E16	31.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	39 jours	Homogène et verdâtre
E17	31.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	1 mois et 7 jours	Homogène et jaune verdâtre
E19	02.08.2018	Sain	Kadiria	Garçon	9 mois	Homogène et jaune verdâtre
E20	02.08.2018	Sain	Kadiria	Fille	1 an	Homogène et jaune verdâtre
E21	02.08.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	4 mois	Homogène et jaunâtre
E25	10.09.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	4 mois	Homogène et jaunâtre
E28	10.09.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	9 mois	Homogène et verdâtre
E30	11.09.2018	Sain	Lakhdaria	Fille	40 jours	Homogène et verdâtre

2. Isolement des bactéries lactiques

2.1. L'enrichissement

Le prélèvement a été effectué à l'aide d'un écouvillon : nous avons pris une petite quantité des selles des enfants et nous avons les met dans des tubes stériles qui contient 5ml de bouillon MRS (enrichissement), les tubes ont été incubé à 37°C pendant 24h.



Figure 12 : l'enrichissement dans de bouillon MRS.

2.2. Isolement sur milieu MRS

L'isolement est réalisé sur milieu MRS solide, milieu adapté à la recherche spécifique des souches lactiques. Une goutte a été prélevée de la solution et ensemencée par étalement sur gélose MRS (pH 5,7). Puis incubée pendant 24 à 72 heures à 37°C dans des boîtes de Petri à l'obscurité (la méthode à la bougie et la jarre en anaérobiose).

Les tubes de bouillon MRS incubés ont été bien homogénéisés (manuellement ou avec un vortex) et ensemencés sur la gélose MRS par des stries série en haute et éloigné en bas en utilisant une pipette Pasteur stérilisé par l'alcool et la flamme de bec benzène (il faut bien brimbaler la pipette et laisser une très petite quantité). L'incubation est faite à 37°C pendant 48-72h.



Figure 13 : l'ensemencement des bactéries lactiques sur gélose MRS.

- ✓ Après 48h, nous avons pris une colonie et nous l'avons mis dans des tubes eppendorfs. Incubation à 37°C pendant 24h.
- ✓ Le lendemain, un 2^{ème} ensemencement a été fait sur les boîtes de gélose MRS à pH 5,7. Incubation à 37°C pendant 48-72h.
- ✓ Nous avons réalisé le teste catalase et la coloration de Gram pour les colonies obtenues, par la suite nous avons fait un deuxième repiquage à ces colonies dans des tubes eppendorfs. Incubation à 37°C pendant 24h. après 24h les tubes ont été laissés dans le réfrigérateur à 4°C.



Figure 14: Tambour à fermeture hermétique.

3. Identification des souches

L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et le teste catalase.

3.1. L'aspect macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation de la culture des isolats sur gélose MRS pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies.

3.2. L'aspect microscopique

L'aspect microscopique est révélé par la coloration de Gram qui a pour but de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif et d'observer la forme et le mode de regroupement des cellules bactériennes. Les bactéries lactiques sont à Gram positif. Les étapes sont mentionnées dans la figure (l'annexe 4).

3.3. Test de catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries en $H_2O + \frac{1}{2} O_2$

4. Purification des souches isolées

La purification des souches isolées a été réalisée par repiquages successifs sur gélose MRS par la méthode des stries. L'incubation a été réalisée à $37^\circ C$ pendant 24 à 72 heures.

La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme. La coloration de Gram a été faite pour confirmer la pureté des souches. Les souches à Gram + et catalase - sont retenue pour la suite de l'étude.

5. Conservation des souches

La conservation des souches lactiques à été réalisé à $4^\circ C$ sur bouillon MRS, dans des eppendorfs stériles.



Figure 15 : Les eppendorfs stériles.

IV. L'activité antibactérienne

La sélection des souches de bactéries lactiques ayant une activité antibactérienne à partir des selles des enfants a été réalisée par le procédé d'antagonisme différé en utilisant la méthode des spots dite sur tapis cellulaire (Mebarki et al., 2016)

Test des spots

L'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard des quatorze souches, est mise en évidence par un test d'antagonisme direct : test des spots (Figure 27)

Les boîtes de Petri sont remplies avec la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5 µl de la suspension bactérienne de chaque souche lactique sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées près du bec bunsen pendant 30 min puis incubées à 37°C pendant 18 h (Fernández et al., 2007).

Après la période d'incubation, les boîtes sont recouvertes de 9 ml d'une gélose nutritive molle en surfusion,ensemencée avec 1 ml de la culture fraîche de la bactérie pathogène (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*) puis incubée à 37°C/24 h. Au terme de la période d'incubation, la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des spots est notée. (Mebarki et al., 2016)

L'inhibition est notée positive lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2 mm (Schillinger et Lucke, 1989).

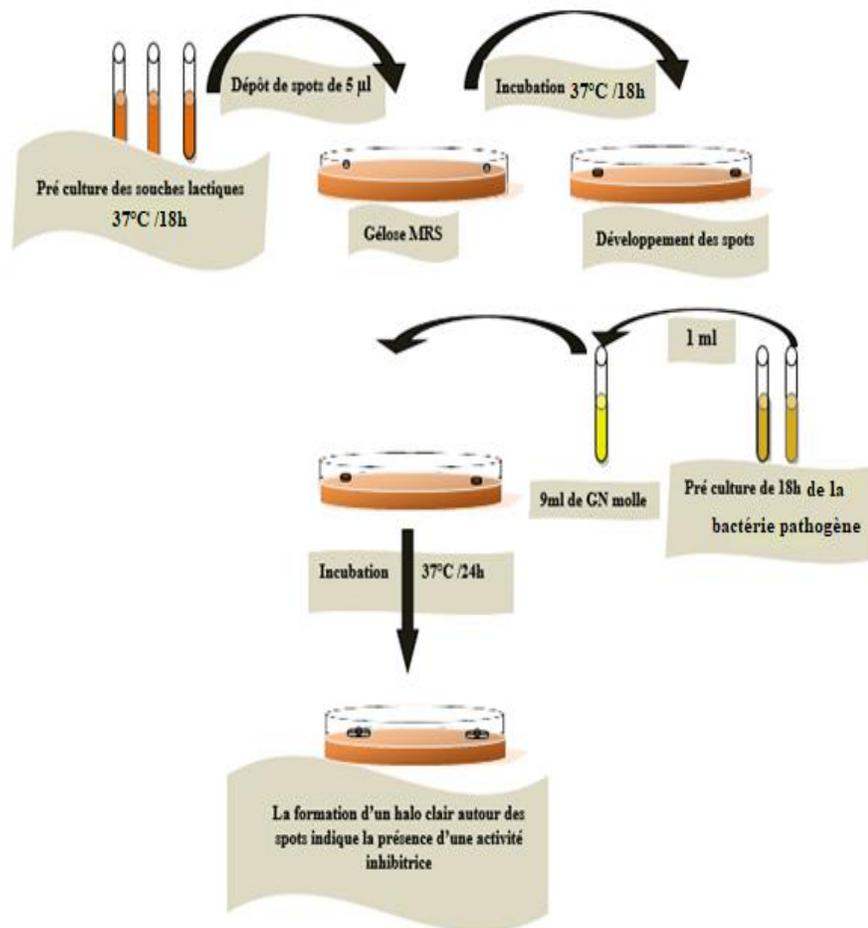


Figure 16: Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots.

Résultats et discussion

I. Isolement et identification des bactéries pathogènes

1. Isolement

Dans ce travail, 14 souches pathogènes ont été utilisées. 7 souches appartenant à l'espèce *Escherichia coli* proviennent de la collection de Mm Benbara (département microbiologie. Université de Bejaia) ; le reste des souches ont été isolées à l'hôpital Amar Ouamrane de lakhdaria dans différents services. L'ensemble des souches isolées ont été purifiées et identifiées par différents tests classiques.

2. Identification des bactéries pathogènes

2.1. Observation macroscopique

La première étape d'identification des bactéries est l'aspect des colonies qui est une étape importantes dans l'identification des bactéries et qui nous permet de préciser les tests de galerie biochimique parfois cette seule étude permet de connaître le germe grâce à ses colonies typiques.

Escherichia coli

Sur milieu EMB, les colonies d'*E. coli* apparaissent en couleur violet foncé, bombées, faiblement confluentes, de 2 à 3 mm de diamètre, à centre noir étendu à plus des 3/4 du diamètre et qui présentent un éclat métallique verdâtre en lumière réfléchi cet éclat dû à la fermentation rapide du lactose. (**Figure 17 A**)

Staphylococcus aureus

Sur milieu Chapman, les souches de *Staphylococcus aureus* élaborent leur propre pigment. Les colonies s'entourent en 24 à 48 heures d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol. (**Figure 17 B**)

La sélectivité de milieu Chapman est basée sur la présence de chlorure de sodium qui inhibe la plupart des bactéries à Gram (+) et à Gram (-). La différenciation des Staphylocoques est basée sur leur capacité à fermenter ou non le mannitol. S'il y a une fermentation, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH).

Pseudomonas aeruginosa

Sur Hektoen, les colonies apparaissent en 24 heures et sont plates (tapis), à bord irrégulier et ont un aspect irisé métallique avec le temps. Un pigment vert brillant diffusible caractérise cette espèce est dû à la production de la pyocyanine (pigment bleu spécifique de *P. aeruginosa*). Une odeur aromatique de type seringa est souvent présente. (**Figure 17 C**)

Klebsiella pneumoniae

L'aspect des colonies sur milieu Hektoen est en relation avec la capacité des microorganismes à fermenter le lactose présent dans le milieu. Cela conduit à une production d'acide qui abaisse le pH et modifie l'indicateur de pH et qui vire du vert au jaune-oronge, Notre souche se présente sous formes de grosses colonies muqueuses, bombées, lactose (+), ayant un aspect d'une goutte de miel, avec une tendance à la confluence. (Figure 17 D)

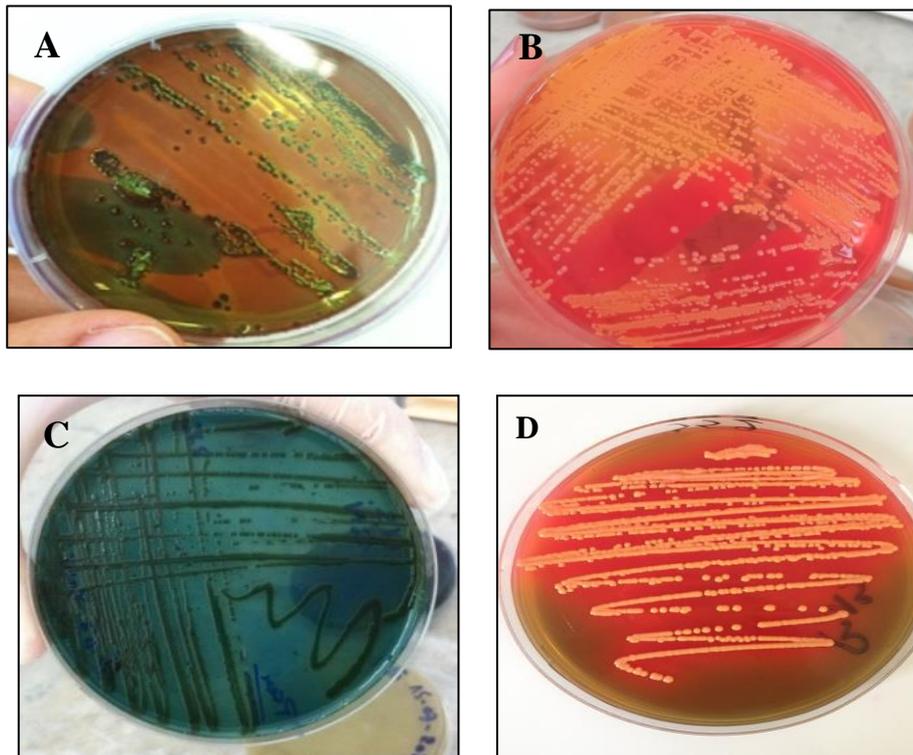


Figure 17 : Aspect des colonies des souches pathogènes isolées.

A- *Escherichia coli* **B-** *Staphylococcus aureus* **C-** *Pseudomonas aeruginosa*
D- *Klebsiella pneumoniae*.

2.2.Observation microscopique

La technique de coloration de Gram a été appliquée sur des colonies isolées sur milieux pour voir la forme, le type de Gram des bactéries pour confirmer les observations macroscopiques.

Après la coloration de Gram, certains souches purifiées sont apparues sous forme des bacilles roses chez ces bactéries l'alcool mis au contact de cellules colorées, solubilise les lipides de leur paroi. Ces derniers sont alors perdus et la paroi devenue poreuse, puis la Fushine va occuper la place des phospholipides solubilisés et donne une couleur rose. Ce sont des bactéries à Gram négatif.

D'autres souches sont apparues sous forme de grappe de raisin ou diplocoques violet ce sont des bactéries à Gram positif. Les résultats de la coloration des colonies isolées sur les milieux Hektoen, Chapman et EMB sont présentées sur la figure 35

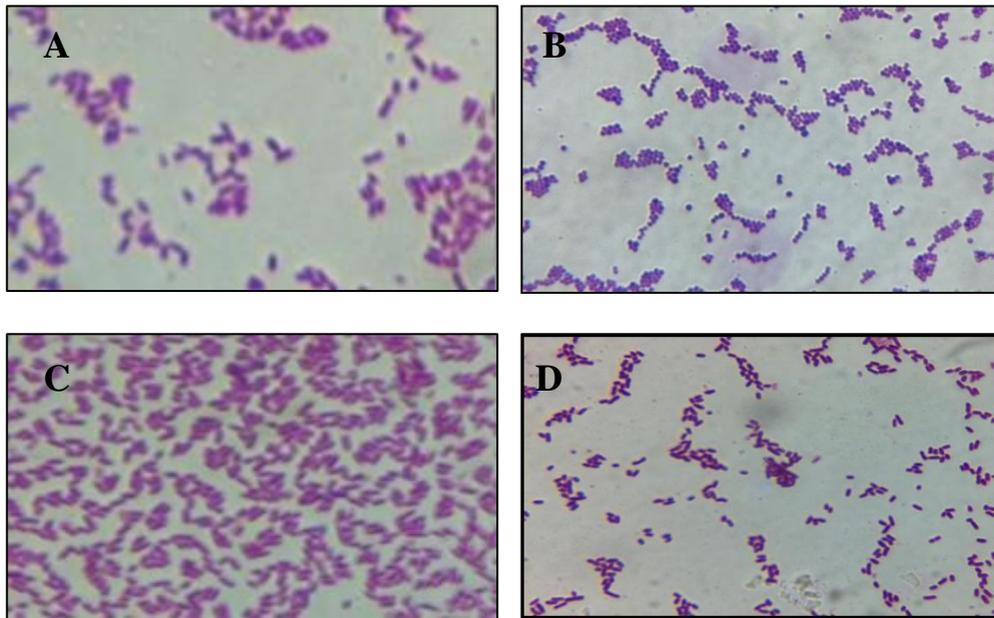


Figure 18 : Observation microscopique des souches pathogènes par microscope photonique G10X100.

A- *Escherichia coli* **B-** *Staphylococcus aureus* **C-** *Pseudomonas aeruginosa*

D- *Klebsiella pneumoniae*

2.3. Identification biochimique

Tableau 05: Tableau d'identification biochimique des bactéries pathogènes.

Tests		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
TSI	lactose	+	+	-	+
	saccharose	+		-	+
	glucose	+	+	-	+
	gaz	+	-	-	+
	H ₂ S	-	-	-	-
Urée-indole	Urée	-	+	-	+
	indole	+	-	-	-
RM et VP	VP	-	+	+	+
	RM	+	+	-	-
Mannitol-mobilité	Man	+	+	-	+
	Mob	+	-	+	-
Recherche des décarboxylases	LDC	+	-	-	+
	ODC	+	-	-	-
	ADH	-	+	-	-
Utilisation de citrate		-	+	+	+
Recherche de la catalase		+	+	+	+
Test d'oxydase		-	-	+	-
Test de la coagulase		/		/	
ONPG		+	-	-	+

Caractère positif (+), Caractère négatif (-).

➤ Test TSI

Après l'incubation, nous avons remarqué que pour *E. coli* et *K. pneumoniae*, il y a eu une acidification dans la pente et le culot, d'où le virage du rouge de phénol au jaune avec présence des bulles d'air et absence de noircissement donc les deux souches sont : lactose et saccharose (+), glucose (+), gaz (+), H₂S (-).

Le même résultat a été observé pour *S. aureus* mais sans production de gaz : lactose et saccharose (+), glucose (+), H₂S (-) et gaz (-).

Pour *P. aeruginosa*, le résultat a été négatif car elle est caractérisée par un métabolisme oxydatif et non fermentatif.



K. pneumoniae



S. aureus



E. coli



P. aeruginosa

Figure 19 : Aspect de milieu TSI

➤ Test Urée-indole

L'uréase

Concernant l'hydrolyse de l'urée, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, ont eu un résultat positif car il y a eu une alcalinisation du milieu d'où le virage de couleur de l'orange vers le rouge-rose.

Pour *P. aeruginosa* et *Escherichia coli*, le résultat a été un uréase (-), car il n'y a pas eu un virage de couleur.



Uréase (-)



Uréase (+)

Figure 20 : Aspect de milieu Urée-indole.

L'indole

Après l'addition du réactif de Kovacs, on a remarqué l'apparition d'un anneau rouge seulement pour *Escherichia coli*, donc elle est indole (+).

Mais pas pour *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* donc elles sont indole (-).



Indole (-)



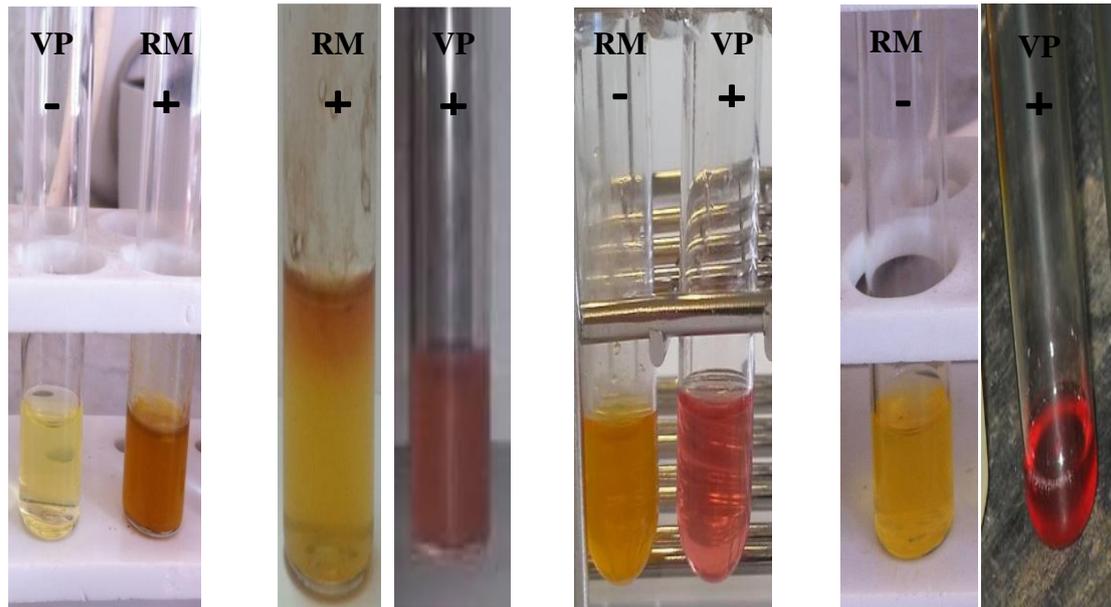
Indole (+)

Figure 21 : Aspect de milieu Urée-indole.

➤ RM et VP

La souche d'*Escherichia coli* est VP négatif car après ajouts des réactifs VP1 et VP2, il n'y a pas eu de réaction. Par contre les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ont donné des résultats positif VP (+) (Coloration rose à rouge).

Concernant le test RM, la souche d'*Escherichia coli* est RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle. Alors que *Klebsiella pneumoniae*, et *Pseudomonas aeruginosa*, sont RM négatif car le milieu n'est pas devenu rouge donc aucune réaction ne s'est produite. La souche *Staphylococcus aureus* est VP, RM positif.



E. coli

S. aureus

P. aeruginosa

K. pneumoniae

Figure 22 : Aspect de milieu Clark et Lubs.

➤ **Mannitol mobilité**

Les résultats qu'on a obtenus montrent que pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*, il y a eu une acidification du milieu, d'où le virage du rouge de phénol au jaune, donc les trois souches sont mannitol (+).

La mobilité se traduit par la diffusion de la croissance à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui a été observé pour *E. coli* et *P. aeruginosa*.



Mannitol (-)
Mobilité (+)



Mannitol (+)
Mobilité (+)



Mannitol (+)
Mobilité (-)

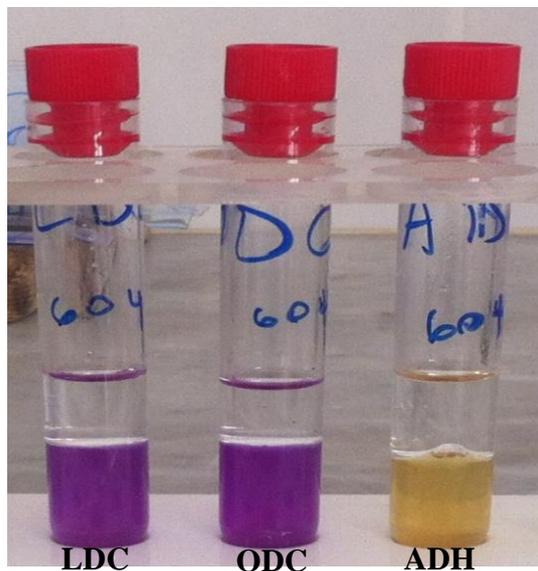
Figure 23 : Aspect de milieu mannitol mobilité.

➤ Recherche des décarboxylases

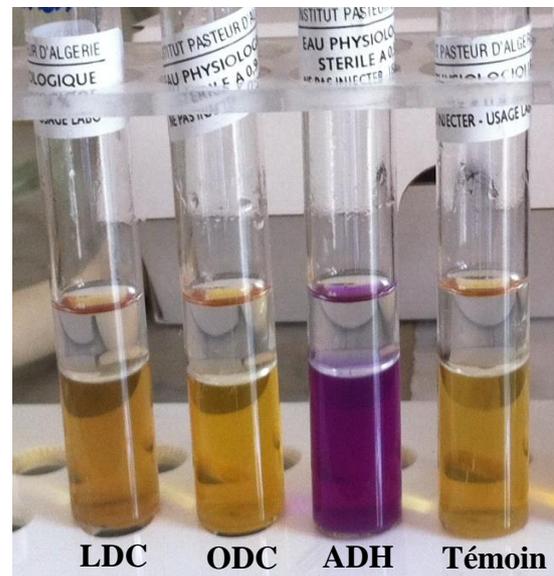
Les souches d'*Escherichia coli* présentent un résultat négatif pour le test **ADH** qui se traduit par un changement de couleur vers le jaune par contre, un résultat positif pour les deux tests **ODC**, **LDC**.

Pour la souche *Klebsiella pneumoniae*, les deux milieux de moëller **ADH** et **ODC** ont changé de couleurs et sont devenus jaunes ce qui indique un résultat négatif. Par contre le milieu **LDC** n'a pas changé de couleur et il est resté violet donc **LDC** positif.

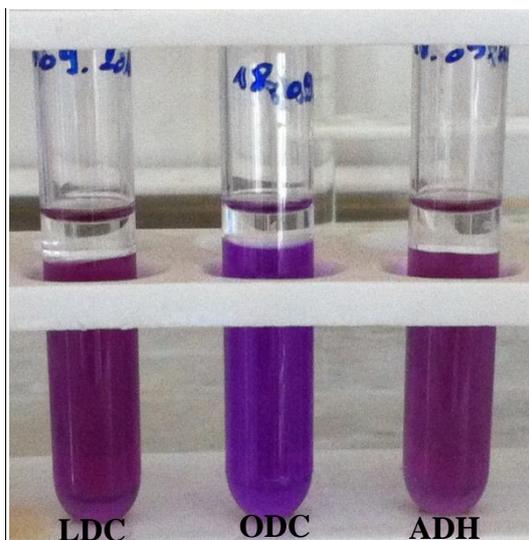
Les tests **LDC**, **ODC** sont négatifs pour *Staphylococcus aureus* mais **ADH** positif, alors que la souche *Pseudomonas aeruginosa* ne possède pas cette décarboxylase et présente des résultats négatifs pour les tests **LDC**, **ODC** et **ADH**.



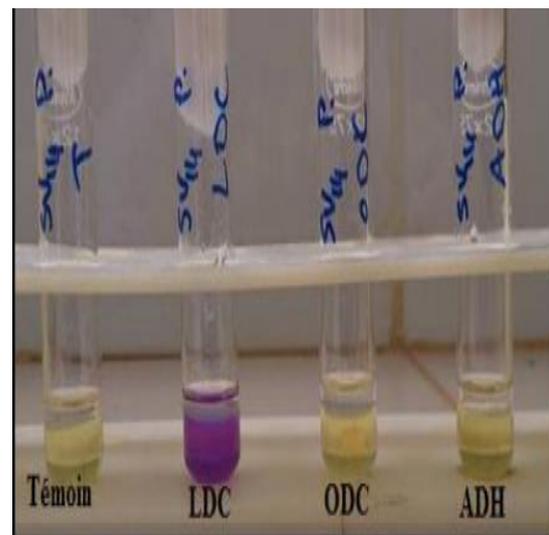
Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



Klebsiella pneumoniae

Figure 24 : Aspect de LDC. ODC. ADH.

➤ **Test citrate de Simmons**

Après 24 h d'incubation nous avons remarqué qu'il a eu un virage de couleur de milieu du vert au bleu ce changement due à l'alcanisation du milieu, c'est ce qui été observé pour *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* qui sont citrate (+), mais ce n'était pas le cas pour *E. coli* qui est citrate (-).



Citrate (-)



Citrate (+)

Figure 25 : Aspect de milieu Citrate de Simmons.

➤ **Production de la B-Galactosidase (test ONPG)**

Les souches d'*E. coli* et *K. pneumoniae* sont pourvues de la β -Galactosidase, elles ont donné un résultat positif c'est-à-dire ONPG (+) où le milieu utilisé devient jaune. Alors que la souche de *P. aeruginosa* et *S. aureus* a donné un résultat négatif avec le test ONPG c'est-à-dire le milieu restait incolore.



ONPG (-)



ONPG (+)

Figure 26 : Résultat de Test ONPG.

➤ **Test de catalase**

Des colonies des quatre types bactériens isolés ont été mises en contact avec de l'eau oxygéné (à 10 volumes). Une effervescence dû à un dégagement de dioxygène a été observé, qui signifie la présence d'une catalase (**catalase +**). *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont une catalase positive.

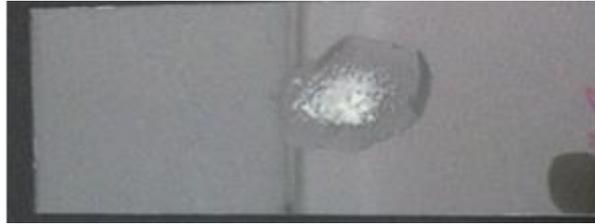


Figure 27 : Résultat positif de test catalase.

➤ **Test oxydase**

Un résultat positif de ce test est traduit par l'apparition d'une coloration violette sur le disque prêt à l'emploi après la déposition d'une colonie à testé, c'était le cas de *Pseudomonas aeruginosa* qui est pourvue d'oxydase (**oxydase +**) , par contre *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus* sont oxydase (-).



Figure 28 : Résultat positif de test d'oxydase.

➤ **Test de coagulase**

Un résultat positif est traduit par la coagulation d'un coagulum qui indique la présence de coagulase c'était le cas de *Staphylococcus aureus*. Le résultat a été observé après 30min d'incubation de mélange de plasma avec des colonies de *S. aureus*.



Figure 29 : Résultat positif de test coagulase.

Tableau 06 : Les espèces pathogènes identifiées par la galerie classique.

Echantillon	Souches pathogènes	Origine (Prélèvement)
E1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sonde urinaire
E2	<i>Escherichia coli 604</i>	Urines
E3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Plaie infectée
E4	<i>Escherichia coli 620</i>	Urines
E5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urines
E6	<i>Staphylococcus aureus53</i>	Pue
E7	<i>Escherichia coli63</i>	Urines

II. L'antibiogramme

Les diamètres de zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés à l'aide d'une règle, puis comparés aux diamètres critiques rassemblés dans les tableaux (**Annexe 3**).

Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible (S), résistante (R), intermédiaire (I)"

1. Profil de résistance d'*Escherichia coli*

Tableau 07 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches d'*E. coli* isolées

Les bactéries \ ATB	AMC	AMP	CL	COT	CTX	CZ	GEN	K	NIT	NO	P	PA	TOB
<i>E.coli 2</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S
<i>E.coli 5</i>	R	R	S	S	S	R	S	I	S	S	R	S	S
<i>E.coli 7</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S
<i>E.coli 11</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S
<i>E.coli 24</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
<i>E.coli 41</i>	S	R	S	I	S	R	S	S	S	S	R	S	S
<i>E.coli 42</i>	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S

Chez les entérobactéries y compris *E. coli*, la plupart des espèces produisent naturellement des β -lactamases chromosomiques donc elle est naturellement résistante à cette famille. (Lagha, 2015)

Nos souches d'*E. coli* isolées montrent une sensibilité vis-à-vis de toutes les familles d'antibiotiques, sauf les β -lactamine utilisés.

Les β -lactamases sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acylenzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle. (Ruppé, 2010)

Tableau 08 : Le profil de résistance/sensibilité des souches *E. coli* récolté au niveau de l'hôpital)

Les bactéries \ ATB	AK	AMC	AMP	CN	CL	COT	CTX	CZ	GEN	K	NO	P	PA	TOB
<i>E.coli 620</i>	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S
<i>E.coli 604</i>	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	I	R	S	S
<i>E.coli 63</i>	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	I

Nos souches d'*E. coli* isolées de l'hôpital montrent une résistance à toutes les familles d'antibiotiques.

Les mécanismes de résistance déployés par *E. coli*, à l'encontre des β -lactamines sont de quatre ordres, parfois plus ou moins associés : défaut de pénétration par imperméabilité de la paroi bactérienne, excrétion de la molécule d'antibiotique, défaut d'affinité pour la cible (PLP), mais la production d'enzymes inactivatrices, les β -lactamases, est le principal mécanisme (Ayad, 2017)

La modification enzymatique de l'antibiotique est le mécanisme de résistance aux aminosides le plus fréquemment observé chez les entérobactéries. (Ayad, 2017)

Les souches présentent une résistance à plus de 5 antibiotiques. C'est des bactéries multirésistante.

2. Profil de résistance de *S. aureus*

Tableau 09 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées, (*S. aureus*).

ATB Les bactéries	AK	AMP	CZ	CTX	CD	COT	E	K	GEN	L	NO	OX	P	PT	RIF	SR	VA
<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	S
<i>S. aureus</i> 53	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R

Le Staphylocoques a coagulase positive présente une résistance importante vis-à-vis des antibiotiques appartenant à la famille de β -lactamine et également à la famille des aminosides.

Plus des 90% du *Staphylococcus aureus* présente une résistance à la pénicilline, nafcillin, oxaciline et méthicilline. Les bases moléculaires de la résistance aux antibiotiques sont déterminées par le gène *mecA*. Ce gène est responsable de la production d'une protéine, la *Penicillin binding protein* (PBP). Or, dans le cas du SARM, ce gène a été modifié pour produire une protéine (PBP-2A) ayant une faible affinité pour la liaison avec les antibiotiques β -lactamines (Bazo, 2011).

Nos résultats montrent que *S. aureus* résistent aux macrolides et Lincosamides par modification de la cible ribosomale. Les gènes erm A, B, C, F, T, Y, 33 codent pour une ARN méthylase qui inhibe la liaison des MLS par la modification des sites cible dans l'ARN23S (Otsuka et al., 2007).

Les glycopeptides (vancomycine) inhibent la synthèse du peptidoglycane en se liant au dimère D-alanyl-D-alanine. La résistance *S. aureus* à la vancomycine est due à deux mécanismes de résistance soit les molécules d'antibiotiques sont piégées par hyperproduction du D-alanyl-D-alanine dans la paroi, elle est due à une anomalie au niveau de la synthèse du peptidoglycane, elle est connu chez les souches Glycopeptide Intermediate *S. aureus* (GISA) ou bien Vancomycine-Intermediate *S. aureus* VISA. Ou bien par l'acquisition du gène vanA qui code pour une molécule D-Lactate au lieu du D-Ala, ces souches sont nommées VRSA (vancomycine resistance *S. aureus*) (Grace et Fetsch, 2018).

On a isolé deux souches de *S. aureus* présentant une résistance à plus de 5 antibiotiques. C'est une bactérie multirésistante.

3. Profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 10 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées, (*Pseudomonas aeruginosa*).

ATB \ Les bactéries	AMP	AMC	C	COT	CTX	CZ	GEN	K	NA	TOB
<i>P. aeruginosa</i>	R	R	I	R	R	R	S	I	R	S

Dans cette étude, la souche de *Pseudomonas aeruginosa* a montré une résistance élevée à tous les antibiotiques testés à l'exception des Aminosides (Gentamycine et Tobramycine).

Les souches de *P. aeruginosa* peuvent produire des enzymes telles la B-lactamase qui inactive les B-lactamines, alors que l'aminoglycoside acétyltransférase, la phosphoryltransferase et l'acétyltransférase inactivent les aminoglycosides. La résistance intrinsèque de la bactérie, qui se traduit par une faible perméabilité de la membrane externe aux différents antibiotiques, joue également un rôle très important. Les LPS et les protéines de la membrane externe (OMPs) seraient responsables de cette obstruction, que ce soit envers les B-lactamines, l'imipenème, les quinolones ou les aminoglycosides (Beaulac, 1995).

Trois mécanismes bactériens viennent expliquer la résistance acquise aux antibiotiques :

- 1) l'inactivation ou la modification du composé par un enzyme.
- 2) une imperméabilité accrue de la membrane externe.
- 3) et une modification de la cible visée.

Cette souche présente une résistance à plus de 5 antibiotiques. C'est une bactérie multirésistante.

4. Profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau 11 : Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées, (*Klebsiella pneumoniae*).

ATB \ Les bactéries	AK	AMP	AMC	CZ	COT	CL	GEN	K	TOB	NIT	NO	PA
<i>K. pneumoniae</i>	S	R	R	R	S	I	S	S	S	S	I	I

K. pneumoniae présente une résistance naturelle (chromosomique) à l'ampicilline. Notre souche de *K. pneumoniae* demeure résistante à toutes les β -lactamines utilisés.

Concernant les autres antibiotiques, notre souche présente une sensibilité entière. Ce qui indique que notre souche isolée est sensible.



Figure 30 : L'antibiogramme *Pseudomonas aeruginosa*

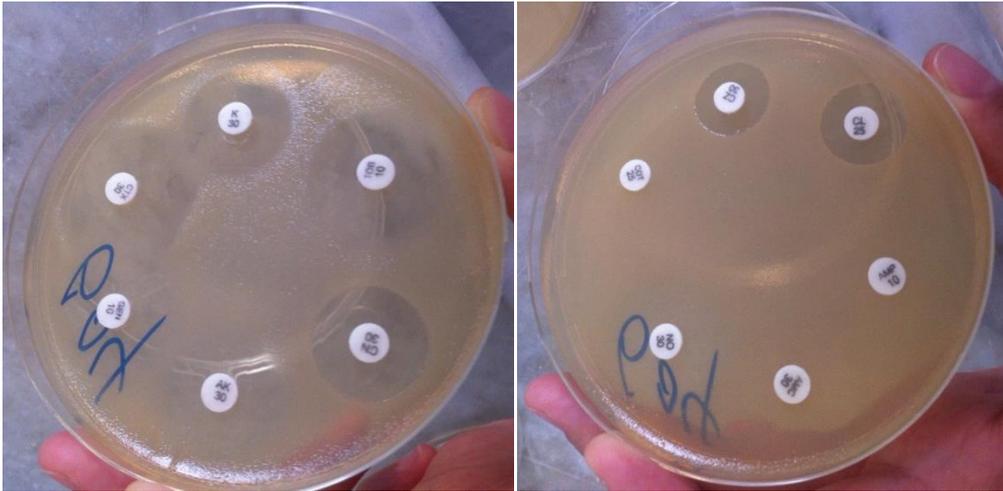


Figure 31 : L'antibiogramme d'Escherichia coli 604



Figure 32 : L'antibiogramme d'Escherichia coli 620



Figure 33 : L'antibiogramme d'Escherichia coli 63



Figure 34 : L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*1



Figure 35 : L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*2

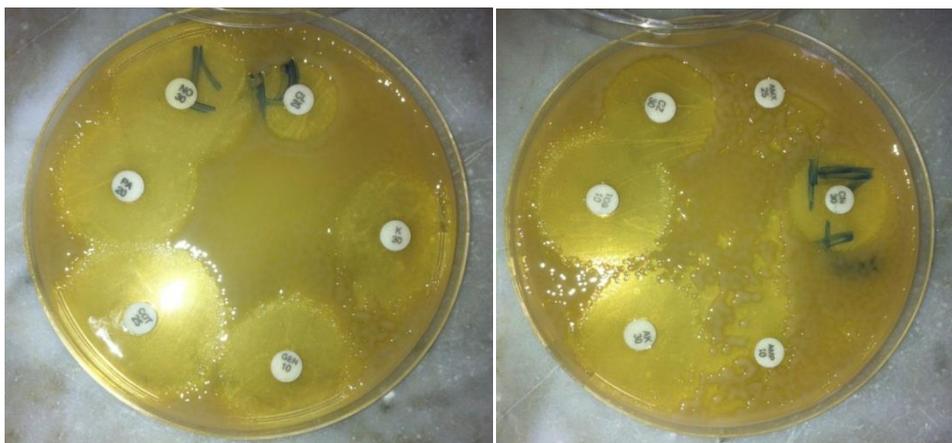


Figure 36 : L'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*

III. Isolement des bactéries lactiques

1. Isolement

Un total de (18) souches de bactéries lactiques, ont été isolés à partir de la matière fécale des bébés. Ces cultures sont obtenues sur milieu MRS après l'incubation à 37 °C pendant 48h.

Tableau 12 : Les souches lactiques identifiées.

Echantillon	Colonies	Catalase	Gram
E4	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille
E5	Colonies petites et blanchâtres	-	bacille
E6	Colonies petites et blanchâtres	-	coccobacille
E8	Colonies petites et blanchâtres	-	bacille
E10	Colonies très petites et blanchâtres	-	bacille
E11	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille
E12	Colonies petites et blanchâtres	-	bacille
E13	Colonies petites et blanchâtres	-	bacille
E14	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille
E15	Colonies petites et blanchâtres	-	bacille
E16	Colonies grandes et blanchâtres claires	-	bacille
E17	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille
E19	Colonies petites et transparentes	-	bacille
E20	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille
E21	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille
E25	Colonies très petites et blanchâtres	-	bacille
E28	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille
E30	Colonies grandes et blanchâtres	-	bacille

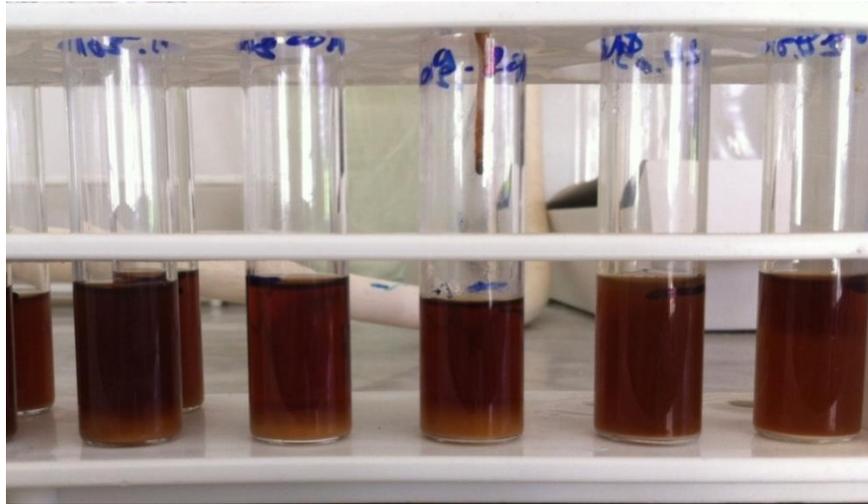


Figure 37: Aspect des isolats ensemencés dans le bouillon MRS après 24h d'incubation à 37°C.

2. Identification des bactéries lactiques isolées

Nous avons utilisé deux milieux MRS à pH 6.2 et à 5.6, une pour l'identification et l'autre pour la réalisation de teste d'antagonisme.

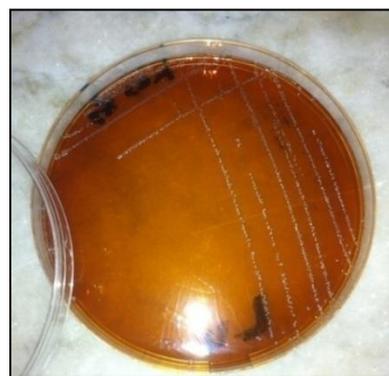
Les colonies isolées et purifiées sur milieu MRS solide sont apparues de taille variable (Ovale, Ronde) avec une couleur blanchâtre ou laiteuse (**figure 38**).

Les tests préliminaires ont démontré que ces souches sont des cocci ou des bacilles à Gram positif et catalase négative, ces critères étant caractéristiques des bactéries lactiques.

2.1. Aspect macroscopique



Bacille



Cocci

Figure 38 : Aspect des isolats ensemencés sur gélose MRS après 48h d'incubation à 37°C.

Sur chaque boîte, les colonies sont classées en catégories selon leur aspect macroscopique. Les grandes colonies blanchâtres et bombées sont des bacilles et les petites colonies transparentes sont des cocci.

2.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique a montré deux formes de cellules, coques et bâtonnets. Le tableau 24 l'annexe 3 résume les différentes observations microscopiques et macroscopiques des isolats.

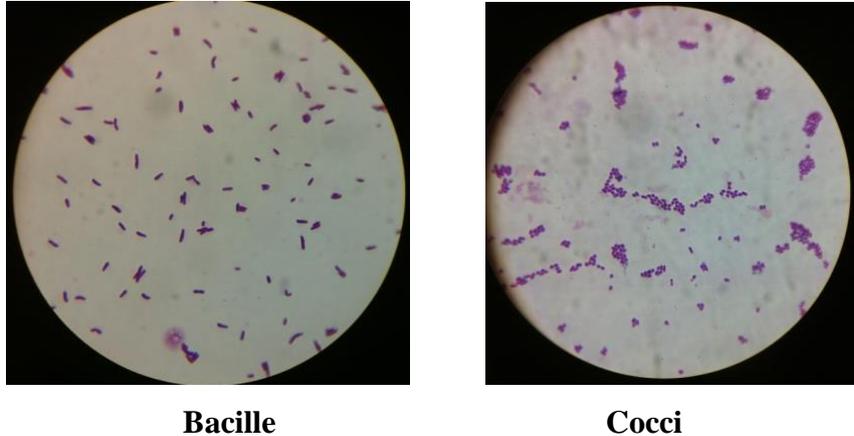


Figure 39 : Observation microscopiques des isolats après une Coloration de Gram (G×100).

2.3. Caractères biochimiques

Les caractéristiques communes aux bactéries lactiques sont : catalase négative, oxydase négative, immobiles, asporulées et ne réduisent pas les nitrates en nitrites (Guiraud, 2003).

Test de catalase

La recherche de la catalase constitue une étape importante dans l'identification des bactéries lactiques, le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y'a production de l'enzyme catalase et que le test est positif (Bourgeois et Larpent, 1996). Pour toutes les colonies testées le test catalase est négatif.

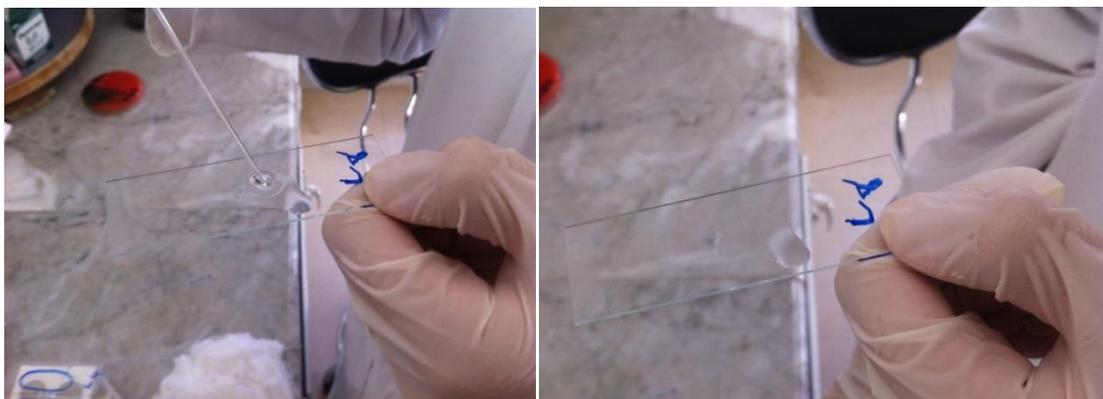


Figure 40: Résultat négative de teste catalase des bactéries lactiques.

IV. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les dix-huit souches lactiques qui nous avons testées selon leurs activités antibactériennes à l'égard de quatorze bactéries pathogènes sensibles et résistantes de type : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches lactiques ont un effet antibactérien vis-à-vis quatorze souches pathogènes (Figure 41).



Figure 41 : Résultats du test de spots des souches lactiques à l'égard de *S. aureus*, *E. coli* *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

Cependant, certaines souches présentent des activités antibactériennes plus importantes que d'autres souches.

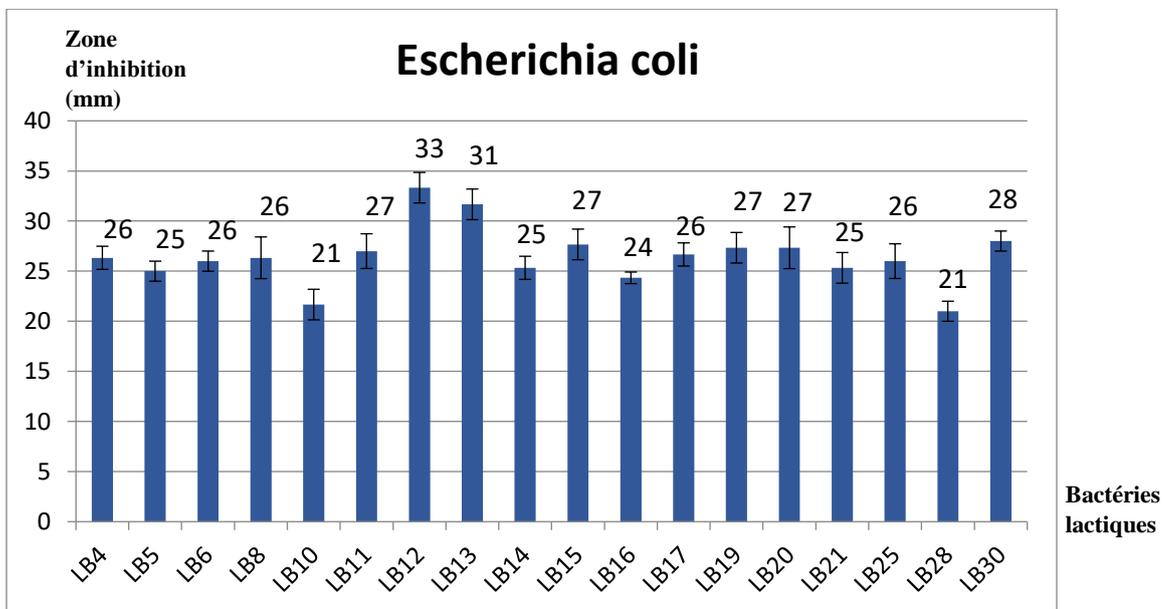


Figure 42 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène *Escherichia coli*

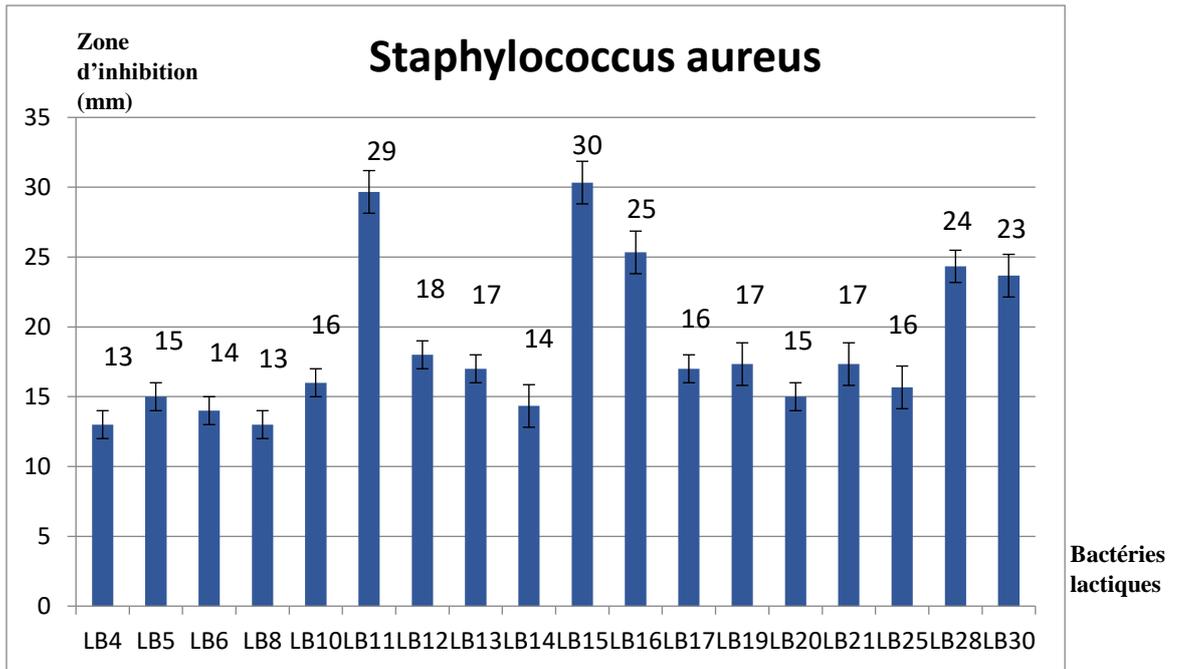


Figure 43 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène *Staphylococcus aureus*.

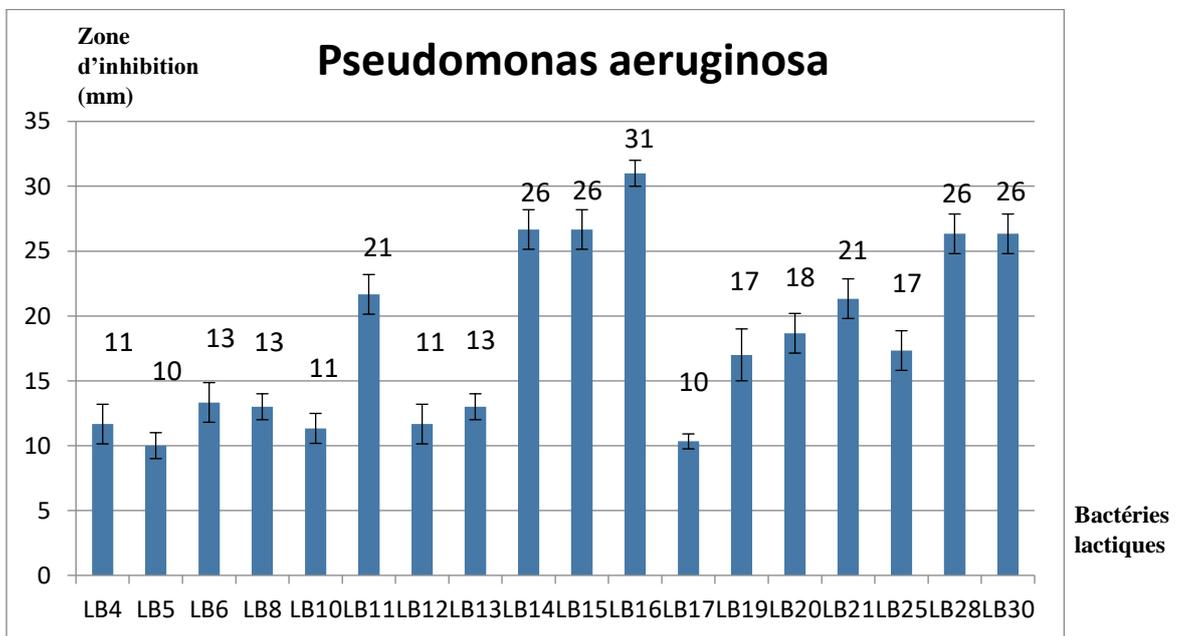


Figure 44 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène *Pseudomonas aeruginosa*

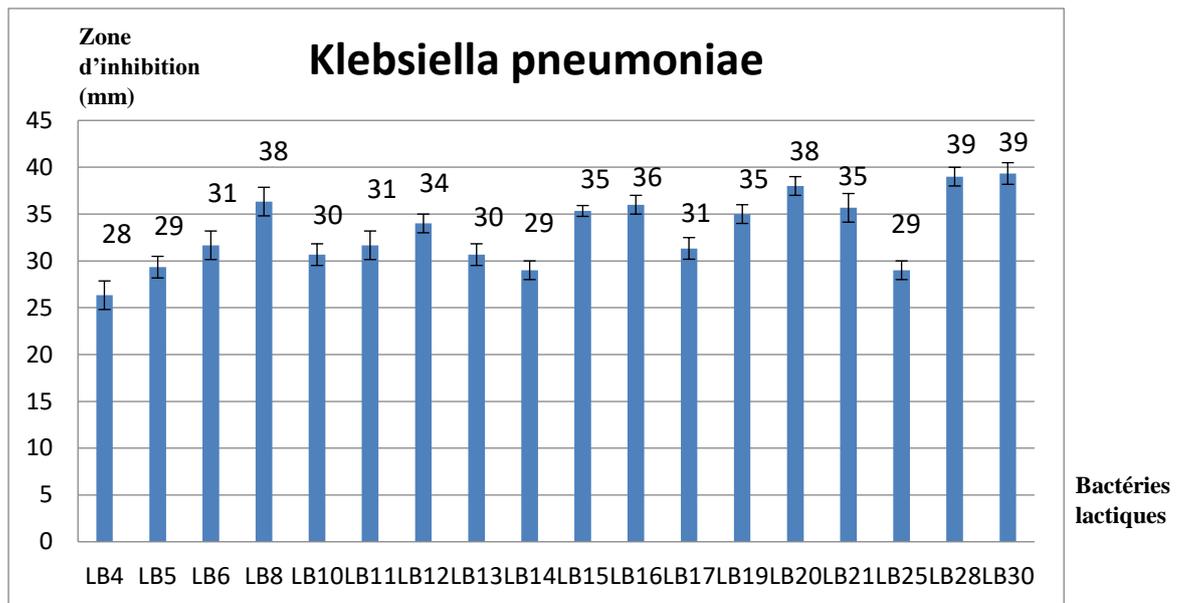


Figure 45 : l'activité des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène

Klebsiella pneumoniae.

D'après les résultats que nous avons obtenus, les souches lactiques étudiées de genre *Lactobacillus* ont une activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (**Schillinger et Lucke, 1989**).

Ce test a montré que ces souches lactiques possèdent un effet inhibiteur vis-à-vis *E. coli* avec des zones d'inhibition variant entre 22mm et 34mm de diamètre, et entre 13mm et 30mm vis-à-vis *S.aureus*. Concernant *K. pneumoniae* les zones d'inhibition varient entre 26mm et 39mm de diamètre, et entre 10mm et 26mm vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

Les travaux de **Noura et Ghoul en 2017**, ont reporté que les diamètres des zones d'inhibitions des bactéries lactiques isolées des selles d'enfants sont de l'ordre de 0 mm à 11 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et entre 07 mm et 14 mm de diamètre vis-à-vis *Escherichia coli*. Ces résultats montrent que les zones d'inhibitions sont inférieures aux celles qu'on a obtenues dans notre étude.

Les résultats que nous avons trouvés dans cette étude à l'égard d'*Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*, sont similaires à ceux obtenus par **Labioui et al en 2005 ; Bedjaoui et Djerrouden 2018**, les zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis *E. coli* varient entre 22,5-31,5mm et 20-36mm respectivement, et vis-à-vis *S. aureus* sont varient entre 23,3-32,5mm et 20-21mm respectivement.

Les travaux de **Savado** *et al.*, en **2004**, ont reporté que les diamètres des zones d’inhibitions des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l’ordre de 9 mm à 10 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et entre 8 mm et 9 mm de diamètre vis-à-vis *Escherichia coli*. Ces résultats montrent que les zones d’inhibitions sont inférieures aux celles qu’on a obtenues dans cette étude.

Djerdir et Nasri. (2018) , ont montré que les lactobacilles ont un effet antagoniste sur *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* avec des zones d’inhibition qui varie entre 12-22mm et 0mm -16mm respectivement. Les résultats de *P. aeruginosa* sont proches aux nôtres, où les diamètres obtenus se situent entre 10mm et 26mm, et les résultats de *K. pneumoniae* sont plus inférieure aux notre où les diamètres obtenus se situent entre 26mm et 39mm.

D’après **Benddine et Djebrite. (2015)** ; **Abid. (2015)** , les lactobacilles n’ont pas une activité antibactérienne vis-à-vis la souche *pseudomonas aeruginosa* ces résultats sont différent à ce que nous avons trouvé.

A noter que l’effet des souches lactiques qui représentent une activité antibactérienne bien distinct à l’égard des souches pathogènes utilisées (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) dans le test des spots est dû soit à la concentration des substances, soit à la résistance de ces souches cibles à ces substances (**Sahed, 2016**).

1. L’activité des bactéries lactiques vis-à-vis une souche à Gram positif et a Gram négatif

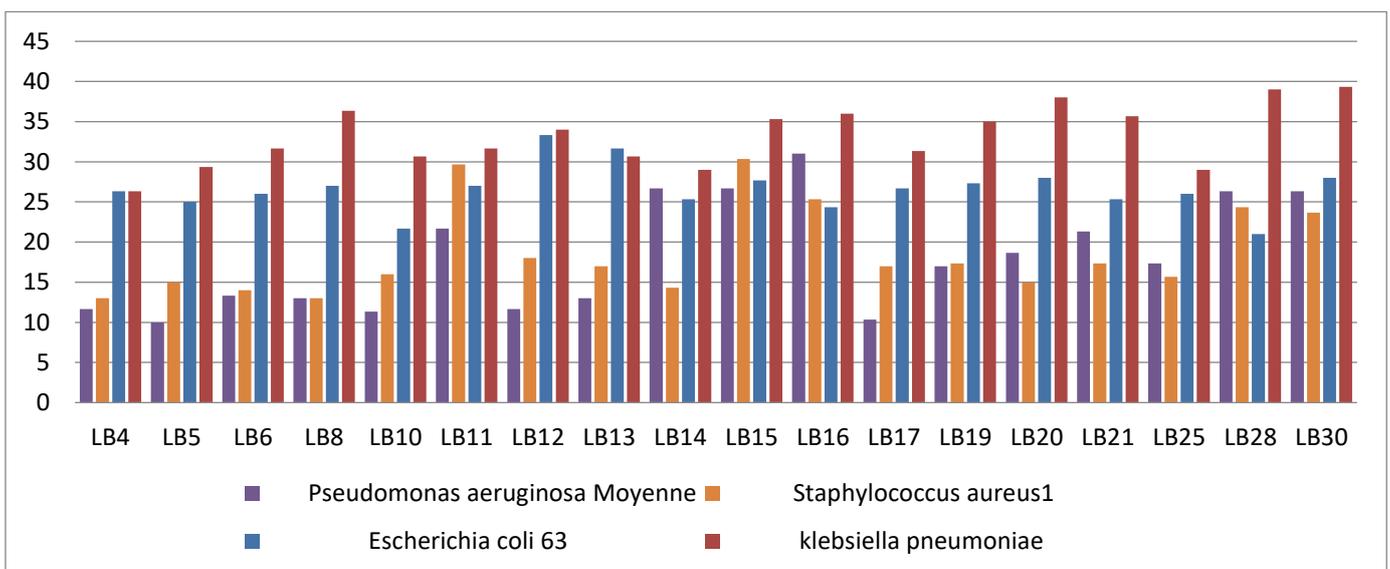


Figure 46 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l’égard de souches pathogènes Gram positif et Gram négatif.

Les résultats obtenus montrent que les souches lactiques ayant un large spectre d'activité sur des bactéries Gram positif bien que les Gram négatif.

Nos souches lactiques présentent une activité inhibitrice plus importante à l'égard d'*E. coli* et *K. pneumoniae* avec des zones d'inhibitions variant entre 21mm - 33mm et 26mm-39mm respectivement, que celle observé contre *S. aureus* avec des zones variant entre 13mm-29mm.

Nos résultats sont conformes aux résultats de **Mameche (2008) ; Boudersa et Nekaa (2017)**, qui ont constaté que les lactobacilles ont une activité inhibitrice sur les bactéries à Gram négatif nettement supérieure à celle observée contre les pathogènes à Gram positif.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* Les souches lactiques présentent une activité inhibitrice inférieure que celle enregistré avec *S. aureus* avec des zones d'inhibitions variant entre 10mm - 26mm contre 13mm-29mm respectivement

Nos résultats sont conformes de ceux obtenus par **Abid. (2015)**, qui constate que les lactobacilles sont plus actifs contre les souches à Gram positif représenté par *S. aureus*, contre les souches à Gram négatif représentées par *Pseudomonas aeruginosa*.

Les bactéries Gram+ sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques, Les bactériocines sont surtout actives sur les pathogènes à Gram+ et agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires (**Labioui et al., 2005**).

En effet, les bactéries Gram négatif sont connues pour leur intolérance aux acides (**Sorreles et Speck, 1970 ; Gilliland et Speck, 1977**). Il a été rapporté que la bactérie *E. coli* et les autres bactéries pathogènes sont sensibles au pH bas, comme le cas de l'espèce *E. coli* O157:H7 qui est incapable de croître dans un milieu dont le pH est compris entre 3.6 à 4.2 (**Poppi et al., 2015**). L'utilisation de bactérie productrice d'acide organique tels que les bactéries lactiques, est l'une des anciennes méthodes utilisées le contrôle de la croissance des bactéries Gram négatif (**Helander et al., 1997**).

2. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis les bactéries sensibles.

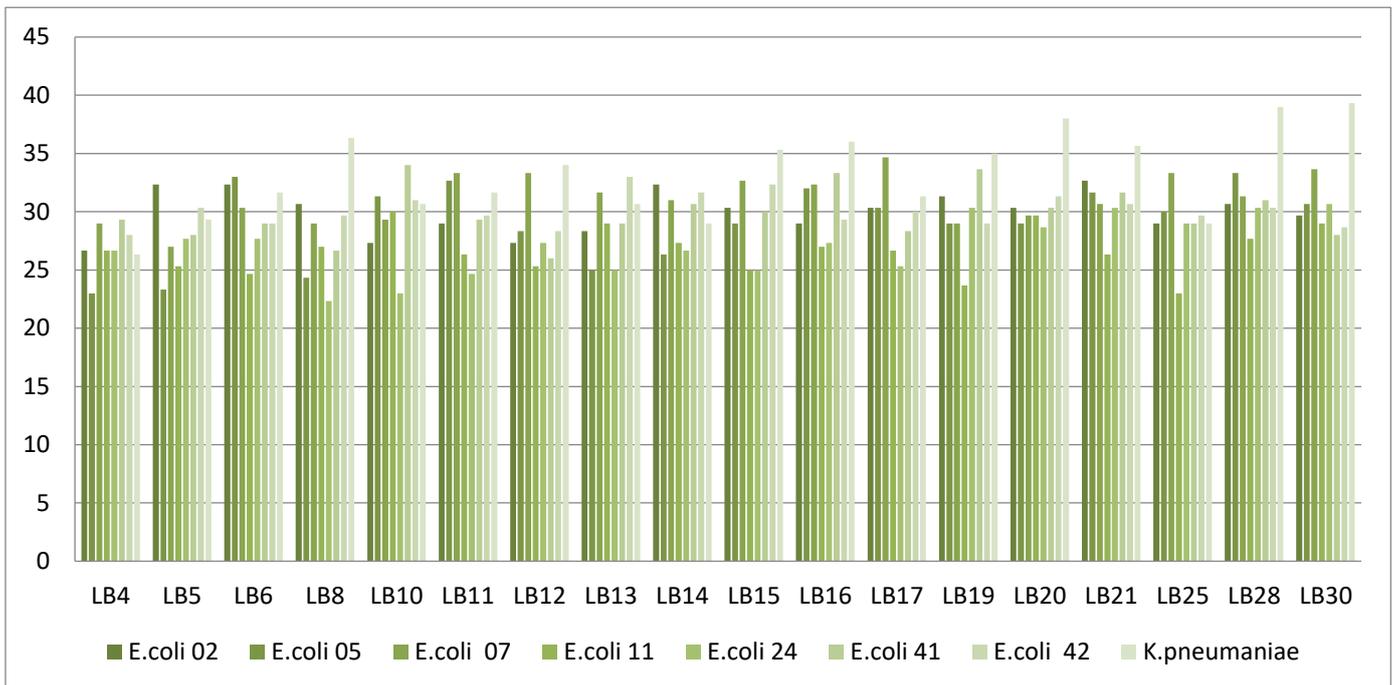


Figure 47 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de souches pathogènes sensibles

Dans l'ensemble, le test a révélé une bonne activité des souches lactiques contre les souches pathogènes sensibles avec des zones d'inhibition variant entre 22mm et 39mm de diamètre.

Les souches (**LB 28 et LB 30**) qui appartiennent au genre *Lactobacillus*, montrent une activité importante avec des zones d'inhibition de 27mm à 39 mm de diamètre vis-à-vis les huit souches pathogènes sensibles d'*E. coli* et *K. pneumoniae*. Par contre les autres souches lactiques on remarque qu'elles montrent une activité modérée avec des zones d'inhibition de 22 mm à 34mm de diamètre.

Les meilleures zones d'inhibition ont été observé sur *K. pneumoniae* avec les souches lactiques **LB 28** et **LB 30** qui appartiennent au genre *Lactobacillus* avec des zones d'inhibition de 38mm et 39mm respectivement.

Les zones d'inhibition observées sur l'ensemble des souches d'*E. coli* sensibles montrent des zones à des valeurs adéquates entre ces souches variant entre 22mm et 34 mm.

Selon l'étude de **Bendine et Djebrite. (2015)** sur l'activité antimicrobienne on note que les souches lactiques ayant une activité antibactérienne vis-à-vis les souches *E.coli* sensibles avec un spectre d'activité entre 0mm et 33mm, ces résultats sont inférieurs a notre.

Selon les travaux de **Labioui et al., (2005)**, les zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* varient entre 22,5 et 31,5 mm. Ces valeurs sont inférieures aux valeurs obtenues dans notre étude.

Djerdir et Nasri. (2018) , ont montré que les lactobacilles ont un effet antagoniste sur *E .coli* avec des zones d'inhibition qui varie entre 25-36mm. Ces résultats sont similaires aux notre où les diamètres obtenus se situent entre 22mm et 34mm.

Nos résultats sont similaires avec les travaux de **Sahed. (2016)**, qui ont trouvés des zones comprises entre 24 et 40mm lorsqu'elle a sélectionné des souches de bactéries lactiques antibactériennes à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* prélevée des urines.

3. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis les souches résistantes

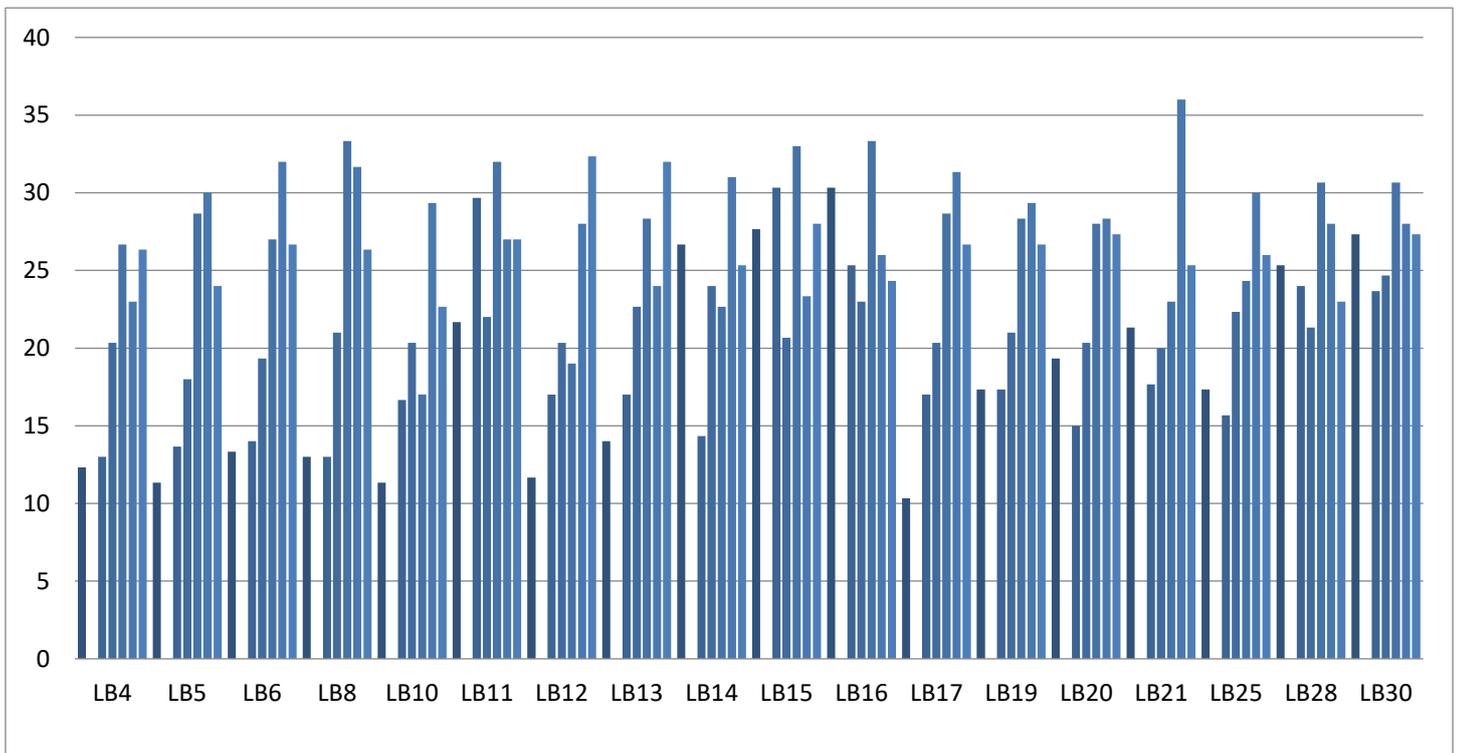


Figure 48 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de souches pathogènes résistantes.

Ce test a montré que ces souches lactiques possèdent un effet inhibiteur vis-à-vis les souches pathogènes résistantes avec des zones d'inhibition qui se diffère d'une souche a une autre et variant entre 10mm et 30mm de diamètre.

Les souches (**LB 08, LB 15, LB 16, LB 28 et LB 30**) qui appartiennent au genre *Lactobacillus*, nous avons remarqué qu'elles montrent une activité importante avec une zone d'inhibition vis-à-vis les souches pathogènes résistantes de 20 mm et 36 mm de diamètre respectivement. Par contre nous avons remarqué que les souches (**LB 04 et LB 10**) montrent une activité faible avec une zone d'inhibition 10 mm et 20 mm de diamètre respectivement.

La meilleure activité antibactérienne à l'égard d'*Escherichia coli* a été enregistrée avec les souches **LB 08, LB 12, LB 13 et LB 30**. Concernant *Staphylococcus aureus*, la meilleure activité a été enregistrée avec les souches **LB 11, LB15, LB 28 et LB 30**. Pour *Pseudomonas aeruginosa* la meilleure activité a été enregistrée avec les souches **LB 14, LB 15, LB 16, LB 28 et LB 30**.

Les résultats obtenus par **Hamouch et Bouzidi. (2018)**, ont révélé une importante activité à l'égard des souches multirésistantes avec des zones d'inhibitions bien distinctes dont le diamètre varie entre 11 à 23 mm et cela en fonction de la souche étudiée. Ces résultats montrent que les zones d'inhibitions sont inférieures aux celles trouvé dans notre étude avec des zones d'inhibition varient entre 10 mm et 36 mm.

Selon **Labiouiet al., (2005)**, l'activité antibactérienne diffère d'une souche de *Lactobacillus* à l'autre. L'absence d'activité antibactérienne ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car n'étant pas polaire ou bien constituée de composés non polaires.

Les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche de *Lactobacillus* peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture (**Prescott, Sherwood et al., 2010**).

4. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis une souche sensible et souche résistante

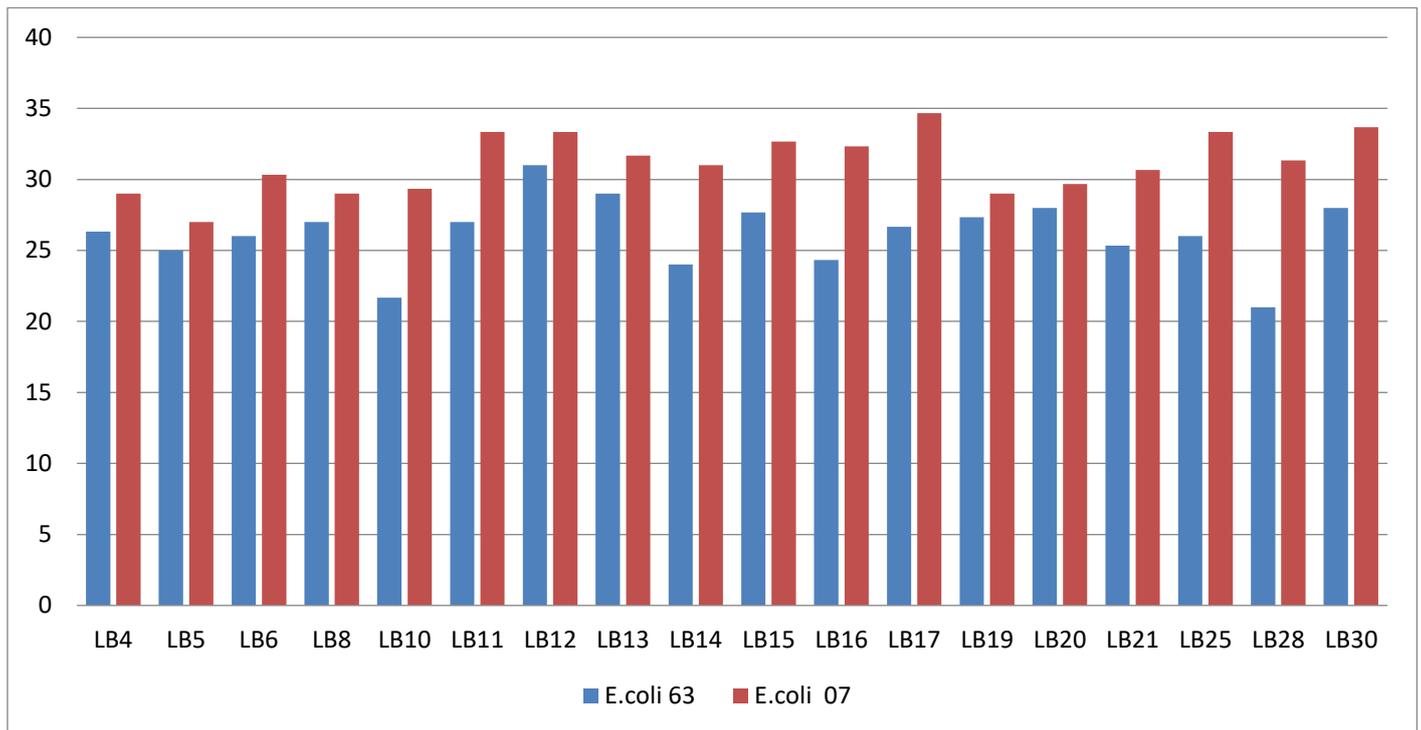


Figure 49 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de souches pathogènes sensibles et résistantes.

D'après le diagramme qui représente l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de deux souches d'*E. coli*, une sensible (*E. coli* 07) et l'autre résistante (*E. coli* 63). Nous avons constaté que ces bactéries lactiques ont une activité sur les deux souches, mais avec des zones d'inhibition plus importantes sur la souche *E. coli* sensible que sur la souche *E. coli* résistante avec des zones variant entre 27mm et 34mm pour la souche sensible, et entre 23mm et 27mm pour la souche résistante.

La meilleure activité antibactérienne a été enregistrée avec les souches lactiques **LB 30 LB 25 et LB 17** avec des zones variantes entre 34mm et 33mm vis-a-vis d'*E. coli* 07 sensible. Et pour *E. coli* résistante activité antibactérienne a été enregistrée avec les souches lactiques **LB 12 LB 13 LB 30** avec des zones variantes entre 28mm et 31mm.

L'activité antibactérienne des souches lactiques est probablement due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique par son pouvoir acidifiant du milieu inhibe plusieurs types de bactéries. A cela s'ajoute aussi l'effet du diacétyl connu également par son pouvoir d'inhibition. L' H_2O_2 libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif. Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes suite à la libération de

substances de nature protéique, les bactériocines (**Tabak. A et Bensoltane. A. 2012 ; Labioui. H et al., 2005; Mami et al., 2010**).

L'acide lactique est le métabolite principal de la fermentation des bactéries lactiques. A pH acide, une grande quantité d'acide lactique est sous la forme non dissociée, cette forme est toxique pour beaucoup de bactéries, champignon et levures (**Podolak et al., 1996**).

Les acides lactiques et acétiques ont un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**De Vuyst et Vandamme, 1994**). Le premier effet des acides organiques correspond à une diminution du pH, qui est préjudiciable à des nombreux micro-organismes. Le second effet est lié aux activités spécifiques des formes dissociées ou non dissociées des acides organiques (**Raibaud, 1994**).

L'effet inhibiteur de la forme moléculaire semble être lié à la possibilité des acides non dissociés lipophiles de traverser la membrane bactérienne. Dans l'environnement cytoplasmique où le pH est plus élevé, l'acide se dissocié et produit des ions H⁺ qui interfèrent avec la machinerie enzymatique de la cellule. Ainsi, ils annulent la force promotrice de la membrane et les processus de transport membranaire de la cellule (**DeVuyst et Vandamme, 1994**).

En effet **Lezrag, 2016** a note que la faible inhibition des bactéries Gram négatif par le bactériocines des bactéries lactiques est due a plusieurs raisons, parmi lesquelles nous pouvons citer leurs résistances aux bactériocines, la membrane cytoplasmiques qui constitue une réelle barrière en les empêchant d'atteindre leurs cible et d'exercer leurs fonctions (**Stevence et al., 1992 ; Gao et al., 1999 ; Zhou et al., 2016**). **Kang et Lee 2005** en rapporte que *E. coli* était résistante aux bactériocines et que les bactéries gram négatifs sont habituellement considéré comme étant résistantes aux bactériocines des bactéries lactiques.

Conclusion

Conclusion

Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la composition de la flore microbienne en bactéries lactiques isolées des selles d'enfants. Les selles montrent une diversité de souches.

L'isolement et l'identification des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* a été effectué à partir des selles d'enfants provient de la région de Lakhdaria wilaya de Bouira. 18 souches isolats ont été caractérisées par leur forme de bâtonnet, Gram positif, catalase négative.

Les *Lactobacillus* identifiées ont été testées pour déterminer leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis quatorze souches pathogènes sensibles et résistantes à Gram+ (*Staphylococcus aureus*) et à Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*). Les résultants d'inhibition révèlent que Les 18 souches ayant une activité antibactérienne vis-à-vis les souches pathogènes sensibles ainsi que les souches résistantes avec une activité plus importante contre les souches sensibles que les souches multirésistantes.

L'activité inhibitrice des bactéries lactiques serait probablement due à la synergie entre les différents métabolites : les acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les souches lactiques pourraient être utilisées comme alternative aux antibiotiques.

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaires, ils doivent être complétés par une série d'autres tests à savoir:

- Il serait intéressant d'approfondir les investigations physico-chimiques et biologiques sur ces extraits afin d'isoler les molécules responsable des activités observées, de souches de *Lactobacillus*
- Elargir l'étude de l'activité sur d'autres bactéries à Gram négatif et positif.
- Des tests sur les bactériocine pure pour confirmer les résultats, contre les Gram positifs.
- Rechercher la nature exacte des facteurs inhibiteurs (l'acide lactique, bactériocines) à l'égard des souches multi résistance.
- Il serait intéressant d'élargir cette étude in vivo en vue d'identifier les composés responsables de cette activité.

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

A

- **Ababsa A.**, 2012. Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de Magister en Génie microbiologique. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Ferhat Abbas- SETIF. 14p
- **Abid Z.**, 2015. Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien «Jben». Mémoire de Master en Biologie/Sciences des aliments. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. 30-51p
- **Abraham E P., Chain E.**, 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146 (3713) : 837-837
- **Adams M R., Hall C J.**, 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*. 23 (3): 287-292.
- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I.**, 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*. 17 (6): 454 - 461.
- **Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.Z., Lendgren S.**, 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2 (2): 131-136
- **Ayad A.**, 2017. Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien. Thèse de doctorat en biologie / microbiologie. Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 03-04p
- **Azmoun S.**, 2016. Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au chu de marrakech. Thèse du doctorat en médecine. Faculté de médecine et de pharmacie – Marrakech. Université Cadi Ayad. 36p

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

B

- **Battraud M P.,** 2017. La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité. Thèse de Doctorat en pharmacie. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille. Université de Lille 2. 13-54p
- **Bazo M.,** 2011. Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Université du québec à montréal. 02p
- **Beulac C.,** 1995. Elaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique. Université du Québec à Trois-Rivières. 10-14p
- **Bedjaoui T., Djerroud F.,** 2018. Optimisation de l'activité antibactérienne de quelques souches de bactéries lactiques. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université A. MIRA – Bejaia. 21-24p
- **Belaidouni N W.,** 2017. Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogènes. Mémoire de Mastère en exploitation des écosystèmes microbiens laitiers. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 04p
- **Belarbi F.,** 2011. Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériens. Mémoire de Magistère en microbiologie Alimentaire et Industrielle Intitulée. Faculté des sciences. Université d'ORAN Es Senia. 11-25p
- **Ben Moussa M T.,** 2016. Les antibiotiques. Laboratoire de pharmacognosie (3ème année). Département de pharmacie Batna. 03p
http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/pharmacognosie3an05-ph_speciale-atb.pdf

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Beneddine H., Djebrit C.,** 2015. Etude de l'activité antimicrobienne des quelques souches lactobacilles isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis des quelques souches pathogènes ciblées. Mémoire de Master Académique en Microbiologie fondamentale et Appliquée. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Kasdi Merbah Ouargla. 15p
- **Benmammar B.,** 2018. Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle en Microbiologie Moléculaire et Protéomics. faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes. 11-16p
- **Benmeziane A., Bennai L.,** 2016. Sélection de souches de bactéries lactiques isolées de l'ben traditionnel à propriétés probiotiques. Mémoire de Master en Microbiologie Alimentaire Santé. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université A. MIRA – Bejaia. 10p
- **Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V.,** 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology.* 50 (1) : 117-131.
- **Bilman B.F, Turhanoğlu M.,** 2016. Antimicrobial activity of Cefaroline and Ceftobiprole tested against MRSA isolates from Turkey 2016. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 11 (1): 52-56
- **Bogdan I C.,** 2008. Antimicrobiol resistance induced by genetic changes. *Journal of Medicin and Life.* 2 (2): 114-123p
- **Boudersa W et Nekkaa R.,** 2017. Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine. 43-42p
- **Boukefoussa Z.,** 2012. Etude de l'effet probiotique de quelques bactéries lactiques vis-à-vis de l'intolérance au lactose. Mémoire du Magister en Biologie/ Sciences Alimentaires. L'Université Hassiba Ben-Bouali- Chlef. 15 p

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Boumediene K.**, 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Mémoire de Magister en Biologie. Faculté des SNV/STU. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen. 04p
- **Bourgeois C M., Larpent J P.**, 1996. Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Technique et documentation, Lavoisier. Paris.* 432-704.
- **Bouzi T., Hamouche S.**, 2018. Effet antibactérien de *Lactobacillus* à l'égard de bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Master. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université A. MIRA – Béjaïa. 18-23p

C

- **Caplice E., Fitzgerald G F.**, 1999. Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 50 (1-2): 131-149.
- **Carine D., Philippe T.**, 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.* 13 (1): 143-154
- **CASFM-EUCAST.**, 2018. comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandation 2018 V.1.0 Février.
- **Cho H Y., Yousef A E., Yang S-T.**, 1996. Continuous production of pediocin by immobilized *Pediococcus acidilactici* PO2 in a packed-bed bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 45 (5): 589-594.
- **Couturier M F., Bex P L., Bergquist P L., Maas W K.**, 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews.* 52 (3): 375-395.
- **Cotter P D., Hill C.**, 2003. Surviving the acid test: response of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67 (3): 429-453.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Cotter P D., Hill C., Ross R P.,** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Natural Review Microbiology*. 3 (10): 777-788.

D

- **Davies J., Davies D.,** 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74 (3): 417-433.
- **De Vuyst L., Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M C., Janssens D.,** 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : bactéries lactiques Loriga, uriage. 1(1) : 25-116.
- **De Vuyst L., Vandamme E. J.,** 1994. Antibacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Ed. Blacki Academic & Profitionel. Londre*. 52 (1): 91-129 p.
- **Djemoui D.,** 2012. Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées. Mémoire Master académique. Faculté des Sciences et de la Technologie et Sciences de la matière. Université kasdi Merbah Ouargla. 17- 18p
- **Djerdir Z., Nasri Kh.,** 2018. Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activités antimicrobiennes. Mémoire de Master en Microbiologie Moléculaire et Médical. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université A. MIRA - Béjaia .12-35p
- **Diall M G.,** 1989. Activité antibactérienne comparée de 3 quinolones (acide nalidixique, péfloxacine et ciprofloxacine) sur 423 souches bactériennes isolées au Mali. Thèse du doctorat en pharmacie. Ecole Nationale de médecine et de pharmacie du Mali. Bamako. 19p

E

- **El abdani S.,** 2016. Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques et conseils en antibiothérapie. Thèse du doctorat en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie – rabat. Université Mohammed V-Rabat. 08-13 p

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Elodie G.**, 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse De Doctorat en biologie moléculaire. Faculté des Sciences et Technique. Université de Corse -Pasquale Paoli France. 5p
- **El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J., Jakobsen M.**, 1998. Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*. 20 (10): 913-916.

F

- **Fernández M ., Martinez B M, Martin M C., Valdivia E., Maqueda M.**, 2007. Hetrologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 102 (5): 1350-1361

G

- **Gao Y., VanBelkum M J., Stiles M E.**, 1999. The outer membrane of gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of Brochocin-C. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (10): 4329 - 4333.
- **Gilliland S E., Speck M L.**, 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative culture. *Journal Food Protection*. 40 (12): 820-823.
- **Grace D., Fetsch A.**,2018. *Staphylococcus aureus*- A Foodborne Pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention, and Control: An Overview In *Staphylococcus aureus*. Elsevier. 8 (1): 3-10.
- **Guetarni H.**, 2007. Etude de l'effet des bactéries lactiques sur l'inhibition des bactéries impliquées dans la physiopathologie digestive *in vitro*. Mémoire de Magister en Sciences alimentaires. Université Hassiba ben Bouali Chlef. 28-52p
- **Guillot J F.**, 1989. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Annales de Recherches Vétérinaires*. 20 (1) : 3-16.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Gunther H L., Blanc H R.,** 1961. The cultural and physiological characters of the pediococci. *Journal of General Microbiology*. 26 (1) : 185-97p.

H

- **Hadadji M.,** 2007. Caractérisation technologique des bifidobactériues à intérêt thérapeutique. Thèse de Doctorat d'état. Université d'Oran. Algérie. 173p.
- **Hedges R W., Jacob A E.,** 1974. Transposi- tion of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Molecular Genetics and Genomics*. 132 (1): 31- 40.
- **Helander I M., Von Wright A., Mattila-Sandholm T M.,** 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*. 8 (5) : 146-150
- **HiMedia.,** 2019. Antimicrobial Susseptibility test Discs. For in vitro Diagnostique. Himedia Laboratoire Pvt Limited. India.
- **Hnich H.,** 2017. La résistance bactérienne. mécanismes et méthodes de détection au laboratoire. Thèse doctorat en médecine. Faculté de médecine et pharmacie Maroc. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 16-30p
- **Holzappel W H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U.,** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition1. *American Journal for Clinical Nutrition*. 73 (2): 365–373p.
- **Huttunen E., Nora K., Yang Z.,** 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *International Dairy Journal*. 5 (5) : 503-513

K

- **Kang J H., Lee MS.,** 2005. Characterization of bacteriocin proced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal Applied Microbiology*. 98 (5): 1169-1176.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Khalid N M., Marth E H.,** 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *A Review. Journal of Dairy Science.* 73 (10): 158-167.
- **Klein A.,** 2014. Jean-Paul Vuillemin (1861-1932) : l'inventeur nancéien du concept d'antibiotique. Hal. Archives-ouvertes. *Revue médicale de l'Est.* 08 (1): 01- 07p
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00984423>

L

- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., Ouhssine M.,** 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux.* 144 (1): 237-250
- **Lagha N.,** 2015. « Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat » .Thèse de Doctorat en Sciences. Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen. 10-11 p
- **Lazreg L.,** 2017. Bactériocines d'entérocoque isolées de lait cru et de beurre de l'Ouest algérien. Thèse de Doctorat en Science. Des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Oran 1. 64-136p
- **Leveau J Y., et Bouix M.,** 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. *Technique et documentation. Lavoisier. Paris.* 85-87.
- **Liu S.** 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology.* 83 (2): 115-131.
- **Lozniewski A., Rabaud C., Nancy.,** 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins. CCLIN Sud-Est. 17 P

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

M

- **Mameche -Doumandji A.**, 2008. Purification et caractérisation de bactériocine produite par des bactéries lactiques autochtones isolées. Thèse : sciences alimentaires, institut national agronomique, Algérie, 14p.
- **Mami A., Kihal M., Hamedi A R., Henni J E ., Kerfouf A.**, 2010. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*, les technologies de laboratoire. 21 (5): 27-33.
- **Mami A.**, 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocine à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. Université d'Oran. Faculté des sciences. 39p
- **Manson J M., Hancock L E., Gilmore M S.**, 2010. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance and other traits. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 107(27): 2269-74p.
- **Marks M I.**, 1981. The pathogenes is and treatment of pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics*. 98(2) : 173-179
- **Mattarelli P., Biavati B.**, 2014. The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. Lactic acid bacteria, *Biodiversity and taxonomy*. 30 (1): 509- 541.
- **Mebarki B., Aoughlis A.**, 2016. Etude de l'activité anti-*E. coli* de souches de bactéries lactiques isolées de différents produits laitiers. Mémoire du MASTER en Microbiologie Alimentaire et Santé. Université A. MIRA – Bejaia. 12-13 p
- **Mehidi N.**, 2015. Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle. Mémoire du Diplôme Master en Agronomie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaib Tlemcen Algérie. 23-25p

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Menad N.**, 2017. Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella sp*. Thèse de doctorat en sciences. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. 10-12p
- **Meskine A., Benabdelkader L.**, 2016. Etude de la résistance et la multirésistance aux antibiotiques de souches isolées du milieu hospitalier. Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine. 02-04 p

N

- **Ndeli L.**, 2009. Etude des prescriptions d'antibiotiques gérées en milieu officinal. Thèse de Doctorat en médecine. Faculté de Médecine de Pharmacie Et d'Odontostomatologie. Université de Bamako. 04p
- **Newman D J., Cragg G M., Sander K M.**, 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*. 66 (1): 1022-1037p
- **Nilsen T., Nes I F., Holo H.**, 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (5) : 2975-84.
- **Noura R., Ghoul M.**, 2017. L'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir des selles d'enfants. Mémoire Diplôme de Master en Analyses biologiques et biochimiques. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Khemis-Miliana. 17p
- **Nouri M., Ziadi F.**, 2015. Etude bactériologique et résistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*. Mémoire de Master en Génétique Moléculaire. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine. 15-17p
- **Novick P R., Schevert P., Ruzin A.** 2001. Pathogenicity and Resistance Islands of *Staphylococci*. *Journal of Microbes and Infections*. 3 (7): 585-594

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

O

- **Orla-jansen, S H.**, 1919. The lactic acid bacteria in biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. (26): 3-29.
- **Otsuka T., Zaraket H., Takano T., Saito K., Dohmae S., Higuchi W., Yamamoto T.**, 2007. Macrolide-lincosamide-streptogramin B Resistance Phenotypes and Genotypes among *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates in Japan. *Clinical Microbiology and Infection*. 13 (3): 325–27

P

- **Pagès J P.**, 2004. Bacterial porin and antibiotic susceptibility. *Medecin Science*. 20 (3): 346-351.
- **Pilet M F., Magras C., Federighi M.**, 2005. Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire. *Economica*. (21): 219-240.
- **Podolak P K., Zayas J F., Kastner C L., Fung D Y C.**, 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on beef by application of organic acids. *Journal of Food Protection*. 59 (4): 370-373.
- **Poppi L B., Rivaldi J D., Coutinho T S., Astolfi-Ferreira C S Ferreira A J P., Mancilha I M.**, 2015. Effect of *Lactobacillus sp.* Isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 35 (4): 353-359.
- **Prescott L M., Harley J P., Klein D A.**, 1995. Microbiologie. De Beck Edition. 1014p
- **Prescott L., Sherwood L M., Woolverton C.**, 2010. Microbiologie. De Boeck Edition. ISBN-978-2-8041-6012-8

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

R

- **Raibaud P.**, 1994. Interactions bactériennes dans le tractus digestif. Dans : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Lorica. 391-436.
- **Ruppé E.**, 2010. Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M. *Antibiotiques*. 12 (1): 3-16.

S

- **Sahed D.**, 2016. Etude de l'activité antibactérienne de quelques souches des bactéries lactiques isolées du l'ben traditionnel à l'égard des souches pathogènes responsables des infections urinaires. Mémoire de master. Université Abderahman Mira. Bejaia. 34p
- **Savadogo A., Ouattara Cheik A T., BassoleImael H N., et Traore A S.**, 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3 (3): 174-179.
- **Schillinger U., Lucke F K.**, 1989. Antibacterial activity of *Lb. sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55 (8): 1901-1906.
- **Singh S B., Barrett J F.**, 2006. Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*. 71 (7): 1006-1015.
- **Sorrels K M., Speck M L.**, 1970. Inhibition of *salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *Journal Dairy of Science*. 59 (2): 338-343.
- **Stiles M E., Holzapfel W.**, 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36 (1): 1-29.
- **Stevens K A., Sheldon B.W., Klaps NA., Klaenhammer T R.**, 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram- negative bacteria. *Journal of food protection* .55 (1): 763-767.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Strus M., Cosiewski T., Kochan P., Heczko P.B.,** 2005. The in vitro effect of Hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *Immunology and medical Microbiology*. 48 (1): 56-63.
- **Sorrels KM., Speck ML.,** 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of dairy science*. 59 (2): 338-343.
- **Svec P., Franz Charle M.A.P.,** 2014. The genus *Enterococcus*. *Biodiversity and taxonomy*. 340-346.

T

- **Tabak S., Bensoltane A.,** 2012. L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technologie*. 6 (1): 71-79.
- **Tamime A Y.,** 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., 261-366p.
- **Teuber M., Geis A.,** 2006. The Genus Lactococcus. 4 (1): 205-228
- **Todorov S V., Diks L.M.T.,** 2005. Production of bactriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *Mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World Journal of Microbiologie and Biotechnology*. 21 (8-9): 1585-1590.

V

- **Vandamme P., Pot B., Gillis M., Devos P., Kersters K., Swings J.,** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiology Reviews*. 60 (2): 407- 438.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Vendramin V., Treu L., Campanaro S., Lombardi A., Corich V., Giacomini A., 2017.** Genome comparison and physiological characterization of eight *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian dairy products. *Food Microbiology*. 63 (1) : 47-57
- **Vinderola G., Zacarías M F, Bockelmann W. , Neve H , Reinheimer J ., Heller K J., 2012.** Preservation of functionality of Bifidobacterium animalis subsp. lactis INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology*. 30 (1) : 274-280
- **Voillot H., 2018.**Résistance et consommation des antibiotiques en ville. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Rouen. 29-30p
- **Vollenweider S., 2004.** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64 (1): 16-27.

W

- **Whiley R A., Hardie J M., 2009.** Genus Streptococcus Rosenbach 1884, 22AL. In: De Vos, P; Garrity G., Jones D et al. (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 nd edn, Vol 3. New York: Springer. 655-711.

Z

- **Zalan Z., Barath A., Halasz A., 2005.** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains. *Food Technology and Biotechnology* . 43 (3): 219- 225.
- **Zhou., VanHeel AJ., Montalban L M., Kuipers O P., 2016.** Potentiating the activity of nisin against Escherichia coli. *Front cell development biology*.7 (4): 1-9

Les annexes

Les Annexes

Annexe 1 : Milieux non biologique

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants

a. Milieux de cultures solides :

- Milieu MRS (de Man-Rogosa et Sharp)
- Mueller-Hinton (Institut Pasteur, Alger)
- Milieu Chapman (Institut Pasteur, Alger)
- Milieu Hektoen (Institut Pasteur, Alger) a été utilisé pour l'isolement des Gram négatifs entéropathogènes (*E. coli*, *P. aeruginosa*).
- Milieu EMB (Eosine bleu de méthylène)
- Gélose nutritive (GN)
- Gélose nutritive molle (GNM)
- Citrate (Institut Pasteur, Alger)
- TSI (Institut Pasteur, Alger)
- Mannitol mobilité (Institut Pasteur, Alger)

b. Milieux de cultures liquides :

- MRS : de Man-Rogosa et Sharp
- BN : Bouillon nutritif (Institut Pasteur, Alger)
- BHIB: Bouillon cœur cervelle (Institut Pasteur, Alger)
- BGT : Bouillon glucose Tamponné (Institut Pasteur, Alger) a été additionné au sang de cheval et utilisé pour donner une concentration élevée des bactéries
- Clark et Lubs (Institut Pasteur, Alger)
- Urée indole (Institut Pasteur, Alger)
- LDC : Lysine décarboxylase (acide aminée). (Institut Pasteur, Alger)
- ODC : Ornithine décarboxylase (acide aminée). (Institut Pasteur, Alger)
- ADH : Arginine dihydrolase (acide aminée). (Institut Pasteur, Alger)

c. Produits chimiques et réactifs

Colorants: Violet de Gentiane, fuschine,

Réactifs: disque d'Oxydase, disque d'ONPG, l'eau oxygénée (catalase), huile de vaseline, kovacs, RM (Rouge de Methylene), VPI (Réactif I de Voges Proskauer)

Alcool et autres: Ethanol, Lugol, eau oxygénée,

Sucres: mannitol, glucose, saccharose, lactose

Les Annexes

Disques d'antibiotiques : Pour étudier le comportement des bactéries pathogènes vis-à-vis des antibiotiques, 20 disques ont été utilisés pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide Muller Hington, il s'agit de :

Colistine (CL) 25mcg, Cifazoline (CZ) 30mcg, Kanamycine (K) 30mcg, Co-trimoxazole (COT) 25mcg, Nitroxoline (NO) 30mcg, Céfotaxime (CTX) 30mcg, Amoxicilline+Acide Clavulanic (AMC) 20mcg+10mcg, Nalidixic (NA) 30mcg, céfalexine (CN) 30mcg, chloramphenical (C) 30mcg, Rifampicine (RIF) 30mcg, Pénicilline-G (P¹⁰) 10 units, Oxacilline (OX) 5mcg, Gentamycine (GEN) 10mcg, Ampicilline (AMP) 10mcg, Spiramycine (SR) 100mcg, vancomycine (Va) 30mcg, Tobramycine (TOB) 10mcg, Amikacine (AK) 30mcg.

d. Appareillage

- Autoclave
- Bain marie
- Microscope optique (Optika)
- Micropipette 1000µl
- Micropipette 0.5 à 10µl (Accumax PRO)
- L'étuve (Jouan)

e. Autre

- | | | |
|-------------------------|----------------------|-------------------------------|
| - Les boites de pétries | - les gants | - les pipettes |
| - Les tubes à essai | - les bavettes | - les eppendorfs |
| - Pince | - les lames | - support |
| - Bec benzène | - les lamelles | - les disques d'antibiotiques |
| - Les écouvillons | - l'huile à émersion | |

Les Annexes

Annexe 2 : Composition de quelques milieux de cultures (g/l)

a. Milieux de cultures solides :

Gélose MRS (De Man, Rogosa et Sharpe)

Ingrédients	g/l
Peptone	10,00
Extrait de viande	10,00
Extrait autolytique de levure	5,00
Glucose	20,00
Phosphate dipotassique	2,00
Acétate de sodium	5,00
Citrate d'ammonium	2,00
Sulfate de magnésium	0,20
Sulfate de manganèse	0,05
Agar	15,00

pH final 6,5

Autoclavage 120°C /20 min

Gélose de Mueller Hinton

Ingrédients	g/l
Infusion de viande de boeuf	300 g/l
Peptone de caséine	17,5 g/l
Amidon de maïs	1,5 g/l
Agar	17 g/l

pH = 7,4



Figure: Gélose Mueller-Hinton.

Les Annexes

Gélose de Chapman

Ingrédients	g/l
Peptones	10 g/l
Peptones	11 g/l
Extrait de viande	1 g/l
Chlorure de sodium	75 g/l
Mannitol	10 g/l
Rouge de phénol	0,025 g/l
Agar	15 g/l

pH= 7,4

Gélose Hektoen

Ingrédients	g/l
Protéose-peptone	12 g/l
Extrait de levure	3 g/l
Lactose	12 g/l
Saccharose	12 g/l
Salicine	2 g/l
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5 g/l
Sels biliaires	9 g/l
Fuchsine acide	0,1 g/l
Bleu de bromothymol	0,065 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Thiosulfate de sodium	5 g/l
Agar	14 g/l

pH= 7,5



Figure: La gélose Hektoen.

Les Annexes

Milieu EMB

Ingrédients	g/l
Peptone	10,0g
Lactose	10,0g
Eosine	0,4g
Bleu de méthylène	0,0625g
Hydrogénophosphate de potassium	2,0g
Agar	15,0g

Milieu TSI

FORMULE - TYPE (pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales) Pour 1 litre de milieu :

Ingrédients	g/l
Tryptone	14,0 g
Extrait autolytique de levure	3,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Glucose	. 1,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Citrate ferrique ammoniacal	0,3 g
Rouge de phénol	24,0 mg
Agar agar bactériologique	13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

Les Annexes

b. Milieux de cultures liquides :

Bouillon MRS :

Ingrédients	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Acétate de sodium trihydraté	5
Citrate d'ammonium	2
Hydrogénophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05
Tween 80	1,0 ml
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,2. Autoclavage : 121°C /20 min.

Pour avoir la gélose MRS : on ajoute 15g d'agar.

Bouillon nutritif :

Ingrédients	g/l
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Peptone	5
NaCl	5
Eau distillée	1000 ml

pH =7,4. Autoclavage 120°C, 20 min.

Pour avoir la gélose nutritive : on ajoute 15g d'agar.

Pour avoir la GN molle : on ajoute 8g d'agar.

Les Annexes

Annexe 3 : Les tableaux

Tableau 01 : Les différents genres de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques (Federighi, 2005).

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques principales	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	bacillus	Homofermentaires Hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	Homme, produits laitiers carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	bacillus	Hétérofermentaires	Psychotropes peu acidotolérants	Produits carnés, poissons produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles croissance à 10 °C et non à 45 C°	Produits laitiers végétaux
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Thermophiles	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles a 45°C et non à 10°C thermorésistante	Intestin de l'homme et des animaux produits laitiers
<i>Pediococcus</i>	Coques tétrades	Homofermentaires	Mésophiles halotolérants	Bière, produits Végétaux
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles halophiles	Saucissons
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Vin
<i>Bifidoacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophile	Intestin de l'homme et des animaux
<i>Vagococcus</i>	Coques mobiles	Homofermentaires	Mésophile	Intestin de l'homme et des animaux produits laitier

Les Annexes

Tableau : les valeurs de référence

Tableau 02 : *Escherichia coli*

Antibiotique	Famille	Symbole	Dose	Diamètres d'inhibition (mm)		
				Résistant	Intermédiaire	Sensible
Amikacine	Aminosides	AK	30 mcg	14	15-16	17
Amoxicilline	Bêtalactamines	AMC	25 mcg	13	14-17	18
Amoxicillin	Bêtalactamines	AMX	25 mcg	27	28-36	37
Ampicilline	Bêtalactamines	AMP	10 mcg	13	14-16	17
Céfalexine	Bêtalactamines	CN	30 mcg	14	-	14
Cefazoline	Bêtalactamines	CZ	30 mcg	19	20-22	23
cefotaxime	Bêtalactamines	CTX	10 mcg	22	23-25	26
Colistine	Polypeptides	CL	25 mcg	10	11-15	16
co-trimoxazole	-----	COT	25 mcg	10	11-15	16
Gentamycine	Aminosides	GEN	10 mcg	12	13-14	15
Kanamycine	Kanamycines	K	30 mcg	13	14-17	18
Nalidixic Acid		NA	30 mcg	13	14-18	19
Nitrofurantoin	nitrofuranes	NIT	300 mcg	14	15-16	17
Nitroxoline	Oxyquinoléines	NO	30 mcg	15	16-24	25
Pipemidic Acid		PA	20 mcg	17	18-25	26
Tobramycine	Aminosides	TOB	10 mcg	12	13-14	15

Tableau 03 : *Staphylococcus aureus*

Antibiotique	Famille	Symbole	Dose	Diamètres d'inhibition (mm)		
				Résistant	Intermédiaire	Sensible
Amikacine	Aminosides	AK	30 mcg	14	15-16	17
Ampicillin	Bêtalactamines	AMP	10 mcg	13	14-16	17
Cefazoline	Bêtalactamines	CZ	30 mcg	14	15-17	18
Céfotaxime	Bêtalactamines	CTX	30 mcg	14	15-22	23
Clindamycine	Lincosamides	CD	2 mcg	14	15-20	21

Les Annexes

co-trimoxazole		COT	25 mcg	13	14-16	17
Erythromycin	Macrolides	E	15 mcg	13	14-22	23
Gentamycin	Aminosides	GEN	10 mcg	13	14-16	17
lincomycin	Lincosamides	L	2 mcg	15	16-19	20
Nitroxoline	Oxyquinoléines	NO	30 mcg	17	18-28	29
Oxacilline	Bêtalactamines	OX	5 mcg	26	27-35	36
Penicillin	Bêtalactamines	P	10 units	28	-	29
Pristinamycine	Synergistines	PT	15 mcg	15	16-20	21
Rifampicine	Rifampicines	RIF	30 mcg	31	32-40	41
Spiramycine	Macrolides	SR	100 mcg	21	22-29	30
Vancomycine	Glycopeptides	VA	30 mcg	14	15-16	17

Tableau 04 : *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotique	Famille	Symbole	Dose	Diamètres d'inhibition (mm)		
				Résistant	Intermédiaire	Sensible
Amoxyclav	Bêtalactamines	AMC	10 mcg	13	14-17	18
Ampicilline	Bêtalactamines	AMP	10 mcg	13	14-16	17
Cefazoline	Bêtalactamines	CZ	30 mcg	19	20-23	24
cefotaxime	Bêtalactamines	CTX	10 mcg	22	23-25	26
chloramphenicol	phénicolés	C	30 mcg	12	13-17	18
Colistin	Polypeptides	CL	25 mcg	11	-	11
co-trimoxazole	-----	COT	25 mcg	10	11-15	16
Gentamycine	Aminosides	GEN	10 mcg	12	13-14	15
Kanamycine	Kanamycines	K	30 mcg	13	14-17	18
Nalidixic	Fluoroquinolones	NA	30 mcg	13	14-18	19
Nitrofurantoin	Nitrofuranes	NIT	100 mcg	11	-	11
Tobramycine	Aminosides	TOB	10 mcg	16	-	16

Les Annexes

Tableau 05 : *Klebsiella pneumoniae*

Antibiotique	Famille	Symbole	Dose	Diamètres d'inhibition (mm)		
				Résistant	Intermédiaire	Sensible
Amikacine	Aminosides	AK	30 mcg	14	15-16	17
Ampicilline	Bêtalactamines	AMP	10 mcg	13	14-16	17
Amoxicilline	Bêtalactamines	AMX	20 mcg	13	14-17	18
Cefazoline	Bêtalactamines	CZ	30 mcg	19	20-22	23
cefotaxime	Bêtalactamines	CTX	5 mcg	16	17-19	20
Colistin	Polypeptides	CL	25 mcg	10	11-15	16
co-trimoxazole	-----	COT	25 mcg	10	11-15	16
Gentamycine	Aminosides	GEN	10 mcg	12	13-14	15
Kanamycine	Kanamycines	K	30 mcg	13	14-17	18
Nitrofurantoin	Nitrofuranes	NIT	300 mcg	14	15-16	17
Nitroxoline	Oxyquinoléines	NO	30 mcg	15	16-24	25
Tobramycine	Aminosides	TOB	10 mcg	12	13-14	15

Tableaux : les zones d'inhibition d'antibiogrammes des bactéries pathogènes

Tableau 06 : les zones d'inhibition des souches *Escherichia coli* sensibles.

Les antibiotiques	Zone d'inhibition en mm						
	<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i>	<i>E. Coli</i>
	2	5	7	11	24	41	42
Amoxicilline	0	0	0	0	0	25	0
Ampicilline	0	0	0	0	0	0	0
Cefazoline	15	16	18	16	15	15	18
Cefotaxime	25	30	26	28	25	25	25
Colistine	18	22	17	24	19	20	21
co-trimoxazole	30	30	35	30	25	15	30
Gentamycine	26	28	25	24	23	27	25
Kanamycine	25	15	24	23	20	25	20

Les Annexes

Nitroxoline	25	30	28	25	27	29	26
Nitrofurantoin	17	19	18	20	18	20	23
Penicillin	0	0	0	0	0	0	0
Peipemic Acid	0	26	0	0	26	30	27
Tobramycine	30	30	28	27	25	23	25

Tableau 07 : les zones d'inhibition des souches *Escherichia coli* résistantes.

Les antibiotiques	Zone d'inhibition en mm		
	<i>E. coli 63</i>	<i>E. coli 604</i>	<i>E. coli 620</i>
Amikacine	15	18	12
Amoxicilline	0	0	0
Ampicilline	0	0	0
Cefazoline	0	0	0
Cefotaxime	0	25	24
Colistine	0	0	15
co-trimoxazole	0	0	0
Gentamycine	15	23	12
Kanamycine	15	20	13
Nitroxoline	0	24	0
Nitrofurantoin	20	25	17
Penicillin	0	30	0
Peipemic Acid	14	30	0
Tobramycine	13	23	22

Les Annexes

Tableau 08 : les zones d'inhibition des souches *Staphylococcus aureus* résistantes.

Les antibiotiques	Les zones d'inhibition en mm	
	<i>S. aureus</i> I	<i>S. aureus</i> II
Amikacine	0	0
Ampicillin	0	0
Cefazoline	0	14
Céfotaxime	0	0
Clindamycine	0	0
co-trimoxazole	30	0
Erythromycin	0	0
Gentamycin	0	26
Kanamycine	0	28
lincomycin	0	0
Nitroxoline	25	0
Oxacilline	0	0
Penicillin	0	0
Pristinamycine	0	0
Rifampicine	0	18
Spiramycine	25	0
Vancomycine	22	0

Tableau 09 : les zones d'inhibition des souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* résistantes.

Les antibiotiques	Les zones d'inhibition en mm	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Amikacin	24	
Amoxiciciline	0	
Ampicilline	0	0
Cefazoline	19	0
Cefotaxime		
chloramphenicol		15

Les Annexes

Colistine	15	
co-trimoxazole	32	0
Gentamycine	21	26
Nalidixic		0
Nitrofurantoin	23	
Nitroxoline	24	
Pipemidic Acid		25
Tobramycine	24	30

L'activité antibactérienne

Tableaux : les zones d'inhibition des les bactéries pathogènes sensibles isolées

Tableau10 : les zones d'inhibition *Escherichia Coli* 02

<i>Escherichia Coli</i> 02					
Bactérie lactique	Essai 1	Essai2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
LB4	25	27	28	26,6666667	0
LB5	30	35	32	32,3333333	2,51661148
LB6	31	32	34	32,3333333	1,52752523
LB8	29	30	33	30,6666667	2,081666
LB10	29	27	26	27,3333333	1,52752523
LB11	30	27	30	29	1,73205081
LB12	27	25	30	27,3333333	2,51661148
LB13	30	28	27	28,3333333	1,52752523
LB14	31	32	34	32,3333333	1,52752523
LB15	30	29	32	30,3333333	1,52752523
LB16	29	28	30	29	1
LB17	29	30	32	30,3333333	1,52752523
LB19	31	30	33	31,3333333	1,52752523
LB20	29	32	30	30,3333333	1,52752523
LB21	30	34	34	32,6666667	2,30940108
LB25	29	28	30	29	1
LB28	30	32	30	30,6666667	1,15470054
LB30	29	28	32	29,6666667	2,081666

Les Annexes

Tableau11 : les zones d'inhibition *Escherichia Coli* 05

<i>Escherichia Coli</i> 05					
Bactérie lactique	Essai 1	Essai 2	Essai3	Moyenne	Ecart type
LB4	23	24	22	23	1
LB5	22	23	25	23,33333333	1,527525232
LB6	33	34	32	33	1
LB8	26	24	23	24,33333333	1,527525232
LB10	30	32	32	31,33333333	1,154700538
LB11	30	35	33	32,66666667	2,516611478
LB12	26	31	28	28,33333333	2,516611478
LB13	27	25	23	25	2
LB14	26	27	26	26,33333333	0,577350269
LB15	28	29	30	29	1
LB16	31	32	33	32	1
LB17	29	32	30	30,33333333	1,527525232
LB19	28	29	30	29	1
LB20	29	28	30	29	1
LB21	30	33	32	31,66666667	1,527525232
LB25	29	31	30	30	1
LB28	34	34	32	33,33333333	1,154700538
LB30	30	32	30	30,66666667	1,154700538

Tableau12 : les zones d'inhibition *Escherichia Coli* 07

<i>Escherichia Coli</i> 07					
Bactérie lactique	Essai 1	Essai 2	Essai3	Moyenne	Ecart type
LB4	27	30	30	29	1,732050808
LB5	26	26	29	27	1,732050808
LB6	29	30	32	30,33333333	1,527525232
LB8	27	32	28	29	2,645751311
LB10	28	29	31	29,33333333	1,527525232
LB11	32	33	35	33,33333333	1,527525232
LB12	32	35	33	33,33333333	1,527525232
LB13	32	33	30	31,66666667	1,527525232
LB14	29	30	34	31	2,645751311
LB15	34	33	31	32,66666667	1,527525232
LB16	35	30	32	32,33333333	2,516611478
LB17	35	33	36	34,66666667	1,527525232
LB19	29	30	28	29	1
LB20	29	32	28	29,66666667	2,081665999
LB21	29	33	30	30,66666667	2,081665999

Les Annexes

LB25	35	32	33	33,33333333	1,527525232
LB28	32	32	30	31,33333333	1,154700538
LB30	34	35	32	33,66666667	1,527525232

Tableau13 : les zones d'inhibition *Escherichia Coli* 11

<i>Escherichia Coli</i> 11					
Bactérie lactique	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
LB4	28	27	25	26,66666667	1,527525232
LB5	25	27	24	25,33333333	1,527525232
LB6	26	25	23	24,66666667	1,527525232
LB8	27	28	26	27	1
LB10	31	30	29	30	1
LB11	29	26	24	26,33333333	2,516611478
LB12	25	28	23	25,33333333	2,516611478
LB13	28	30	29	29	1
LB14	27	25	30	27,33333333	2,516611478
LB15	26	25	24	25	1
LB16	29	25	27	27	2
LB17	26	28	26	26,66666667	1,154700538
LB19	24	25	22	23,66666667	1,527525232
LB20	31	30	28	29,66666667	1,527525232
LB21	25	26	28	26,33333333	1,527525232
LB25	23	22	24	23	1
LB28	27	26	30	27,66666667	2,081665999
LB30	30	29	28	29	1

Les Annexes

Tableau14 : les zones d'inhibition *Escherichia Coli* 24

<i>Escherichia Coli</i> 24					
Bactérie lactique	Essai 1	Essai 2	Essai3	Moyenne	Ecart type
LB4	28	27	25	26,66666667	1,527525232
LB5	27	29	27	27,66666667	1,154700538
LB6	25	28	30	27,66666667	2,516611478
LB8	20	24	23	22,33333333	2,081665999
LB10	23	22	24	23	1
LB11	25	23	26	24,66666667	1,527525232
LB12	28	26	28	27,33333333	1,154700538
LB13	26	25	24	25	1
LB14	27	26	27	26,66666667	0,577350269
LB15	25	24	26	25	1
LB16	25	28	29	27,33333333	2,081665999
LB17	24	25	27	25,33333333	1,527525232
LB19	32	30	29	30,33333333	1,527525232
LB20	29	30	27	28,66666667	1,527525232
LB21	30	32	29	30,33333333	1,527525232
LB25	29	30	28	29	1
LB28	29	30	32	30,33333333	1,527525232
LB30	29	32	31	30,66666667	1,527525232

Tableau15 : les zones d'inhibition *Escherichia Coli* 41

<i>Escherichia Coli</i> 41					
Bactérie lactique	Essai 1	Essai 2	Essai3	Moyenne	Ecart type
LB4	29	31	28	29,33333333	1,527525232
LB5	27	28	29	28	1
LB6	28	30	29	29	1
LB8	25	27	28	26,66666667	1,527525232
LB10	33	34	35	34	1
LB11	28	30	30	29,33333333	1,154700538
LB12	25	27	26	26	1
LB13	30	30	27	29	1,732050808
LB14	30	32	30	30,66666667	1,154700538
LB15	28	30	32	30	2
LB16	33	32	35	33,33333333	1,527525232
LB17	26	30	29	28,33333333	2,081665999
LB19	34	35	32	33,66666667	1,527525232
LB20	30	32	29	30,33333333	1,527525232

Les Annexes

LB21	29	32	34	31,66666667	2,516611478
LB25	29	30	28	29	1
LB28	29	32	32	31	1,732050808
LB30	27	29	28	28	1

Tableau16 : les zones d'inhibition *Escherichia Coli* 42

<i>Escherichia Coli</i> 42					
Bactérie lactique	Essai I	Essai 2	Essai3	Moyenne	Ecart type
LB4	27	28	29	28	1
LB5	32	30	29	30,33333333	1,527525232
LB6	30	29	28	29	1
LB8	32	28	29	29,66666667	2,081665999
LB10	32	32	29	31	1,732050808
LB11	28	32	29	29,66666667	2,081665999
LB12	27	30	28	28,33333333	1,527525232
LB13	33	32	34	33	1
LB14	33	32	30	31,66666667	1,527525232
LB15	33	34	30	32,33333333	2,081665999
LB16	28	31	29	29,33333333	1,527525232
LB17	30	31	29	30	1
LB19	28	30	29	29	1
LB20	32	32	30	31,33333333	1,154700538
LB21	29	33	30	30,66666667	2,081665999
LB25	28	32	29	29,66666667	2,081665999
LB28	29	32	30	30,33333333	1,527525232
LB30	27	30	29	28,66666667	1,527525232

Les Annexes

Tableaux : les zones d'inhibition des les bactéries pathogènes résistantes isolées

Tableau17 : les zones d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa*

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
	essai 1	essai 2	essai 3	Moyenne	Ecartype
LB4	13	12	10	11.6666667	1.52752523
LB5	10	11	9	10	1
LB6	12	15	13	13.3333333	1.52752523
LB8	12	13	14	13	1
LB10	10	12	12	11.3333333	1.15470054
LB11	22	23	20	21.6666667	1.52752523
LB12	13	12	10	11.6666667	1.52752523
LB13	14	12	13	13	1
LB14	27	25	28	26.6666667	1.52752523
LB15	28	27	25	26.6666667	1.52752523
LB16	32	31	30	31	1
LB17	11	10	10	10.3333333	0.57735027
LB19	19	17	15	17	2
LB20	20	19	17	18.6666667	1.52752523
LB21	23	20	21	21.3333333	1.52752523
LB25	16	17	19	17.3333333	1.52752523
LB28	25	28	26	26.3333333	1.52752523
LB30	28	25	26	26.3333333	1.52752523

Tableau 18 : les zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* 1

	<i>Staphylococcus aureus</i> 1				
	essai 1	essai 2	essai 3	Moyenne	Ecartype
LB4	13	12	14	13	1
LB5	14	15	16	15	1
LB6	13	14	15	14	1
LB8	14	13	12	13	1
LB10	17	15	16	16	1
LB11	30	31	28	29.6666667	1.52752523
LB12	19	18	17	18	1
LB13	18	16	17	17	1
LB14	14	13	16	14.3333333	1.52752523
LB15	30	32	29	30.3333333	1.52752523
LB16	25	27	24	25.3333333	1.52752523
LB17	16	17	18	17	1

Les Annexes

LB19	17	16	19	17.3333333	1.52752523
LB20	16	15	14	15	1
LB21	16	17	19	17.3333333	1.52752523
LB25	17	14	16	15.6666667	1.52752523
LB28	25	23	25	24.3333333	1.15470054
LB30	25	22	24	23.6666667	1.52752523

Tableau 19 : les zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* 2

	<i>Staphylococcus aureus</i> 2			Moyenne	Ecartype
	essai 1	essai 2	essai 3		
LB4	19	18	21	19.3333333	1.52752523
LB5	19	17	18	18	1
LB6	19	19	20	19.3333333	0.57735027
LB8	22	20	21	21	1
LB10	21	20	20	20.3333333	0.57735027
LB11	23	21	22	22	1
LB12	20	22	19	20.3333333	1.52752523
LB13	24	23	21	22.6666667	1.52752523
LB14	26	24	22	24	2
LB15	20	20	19	19.6666667	0.57735027
LB16	23	25	21	23	2
LB17	22	20	19	20.3333333	1.52752523
LB19	22	19	22	21	1.73205081
LB20	21	20	20	20.3333333	0.57735027
LB21	20	20	20	20	0
LB25	20	21	23	21.3333333	1.52752523
LB28	21	23	20	21.3333333	1.52752523
LB30	25	26	23	24.6666667	1.52752523

Tableau 20 : les zones d'inhibition d'*Escherichia coli* 620

	<i>Escherichia coli</i> 620			Moyenne	Ecartype
	essai 1	essai 2	essai 3		
LB4	28	26	26	26.6666667	1.15470054
LB5	30	27	29	28.6666667	1.52752523
LB6	28	27	26	27	1
LB8	34	32	34	33.3333333	1.15470054
LB10	15	17	19	17	2
LB11	32	30	31	31	1

Les Annexes

LB12	20	19	17	18.6666667	1.52752523
LB13	30	28	27	28.3333333	1.52752523
LB14	21	23	20	21.3333333	1.52752523
LB15	31	33	32	32	1
LB16	33	30	31	31.3333333	1.52752523
LB17	30	29	30	29.6666667	0.57735027
LB19	28	30	30	29.3333333	1.15470054
LB20	27	29	28	28	1
LB21	24	23	22	23	1
LB25	26	24	25	25	1
LB28	30	30	32	30.6666667	1.15470054
LB30	30	32	30	30.6666667	1.15470054

Tableau 21 : les zones d'inhibition d'*Escherichia coli* 604

	<i>Escherichia coli</i> 604			Moyenne	Ecartype
	essai 1	essai 2	essai 3		
LB4	24	23	22	23	1
LB5	30	30	30	30	0
LB6	30	32	33	31.6666667	1.52752523
LB8	32	32	31	31.6666667	0.57735027
LB10	28	30	30	29.3333333	1.15470054
LB11	28	27	26	27	1
LB12	26	29	28	27.6666667	1.52752523
LB13	24	24	22	23.3333333	1.15470054
LB14	30	33	30	31	1.73205081
LB15	25	24	23	24	1
LB16	25	26	27	26	1
LB17	32	30	32	31.3333333	1.15470054
LB19	29	30	31	30	1
LB20	28	30	30	29.3333333	1.15470054
LB21	35	35	38	36	1.73205081
LB25	30	30	30	30	0
LB28	27	29	30	28.6666667	1.52752523
LB30	28	29	30	29	1

Les Annexes

Tableau 22 : les zones d'inhibition d'*Escherichia coli* 63

	<i>Escherichia coli</i> 63			Moyenne	Ecartype
	essai 1	essai 2	essai 3		
LB4	27	27	25	26.3333333	1.15470054
LB5	26	25	24	25	1
LB6	25	27	26	26	1
LB8	28	27	26	27	1
LB10	22	23	20	21.6666667	1.52752523
LB11	28	28	25	27	1.73205081
LB12	32	35	33	33.3333333	1.52752523
LB13	32	33	30	31.6666667	1.52752523
LB14	26	24	26	25.3333333	1.15470054
LB15	28	26	29	27.6666667	1.52752523
LB16	24	25	24	24.3333333	0.57735027
LB17	26	28	26	26.6666667	1.15470054
LB19	26	29	27	27.3333333	1.52752523
LB20	28	29	27	28	1
LB21	25	27	24	25.3333333	1.52752523
LB25	25	25	28	26	1.73205081
LB28	21	20	22	21	1
LB30	27	28	29	28	1

Tableau 23 : Présentation des échantillons des bactéries lactiques

Echantillon	Date de prélèvement	Etat sanitaire	Région	Sexe	L'âge	Aspect des selles
E1	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	1 mois et 15 jours	Homogène et jaune verdâtre
E2	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	4 jours	Homogène et jaunâtre
E3	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	8 jours	Homogène et jaunâtre
E4	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	10 jours	Homogène et jaunâtre
E5	03.07.2018	Sain	Kadiria	Fille	2 ans	Homogène et verdâtre

Les Annexes

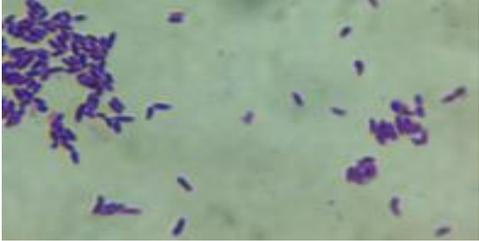
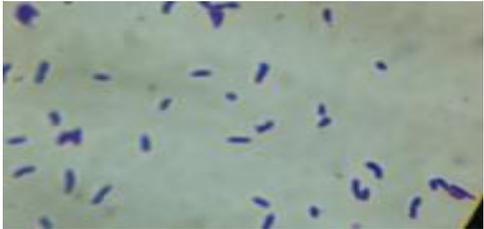
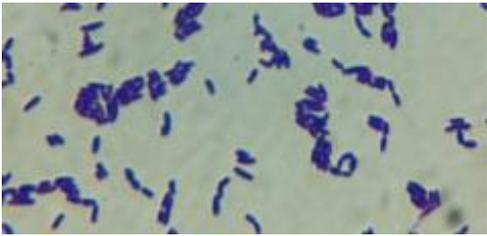
E6	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	1 mois et 8 jours	Homogène et jaune verdâtre
E7	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	2 ans	Homogène et verdâtre
E8	03.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	5 mois	Homogène et jaune verdâtre
E9	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	13 mois	Homogène et jaunâtre
E10	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	7 jours	Homogène et jaunâtre
E11	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	4 mois	Homogène et jaune verdâtre
E12	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	4 mois	Homogène et verdâtre
E13	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	13 jours	Homogène et jaunâtre
E14	30.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	2 mois	Homogène et jaune verdâtre
E15	31.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	6 jours	Homogène et jaunâtre
E16	31.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	39 jours	Homogène et verdâtre
E17	31.07.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	1 mois et 7 jours	Homogène et jaune verdâtre
E18	31.07.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	3 jours	Homogène et jaunâtre
E19	02.08.2018	Sain	Kadiria	Garçon	9 mois	Homogène et jaune verdâtre
E20	02.08.2018	Sain	Kadiria	Fille	1 an	Homogène et jaune verdâtre

Les Annexes

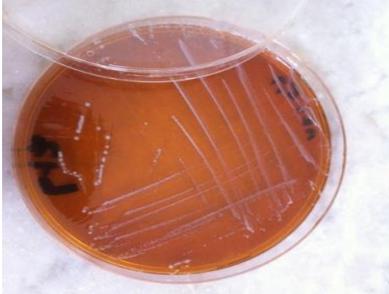
E21	02.08.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	4 mois	Homogène et jaunâtre
E22	08.08.2018	Yaourt	Kadiria			
E23	08.09.2018	Lben	Kadiria			
E24	10.09.2018	Sain	Kadiria	Femme	25 ans	Homogène et verdâtre
E25	10.09.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	4 mois	Homogène et jaunâtre
E26	10.09.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	2 mois	Homogène et verdâtre
E27	10.09.2018	Malade	Lakhdaria	Fille	8 mois	Homogène et verdâtre
E28	10.09.2018	Malade	Lakhdaria	Garçon	9 mois	Homogène et verdâtre
E29	11.09.2018	Sain	Lakhdaria	Femme	24 ans	Homogène et verdâtre

Les Annexes

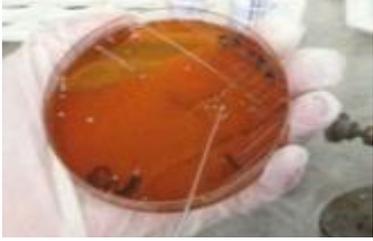
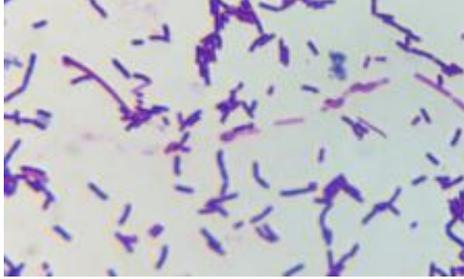
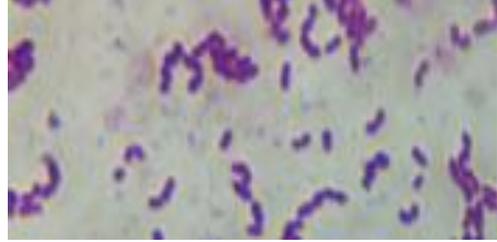
Tableau 24 : résultats macroscopique et microscopique des bactéries lactiques isolées

Echantillon	Colonies	Gram
E4		
E5		
E6		
E8		
E10		

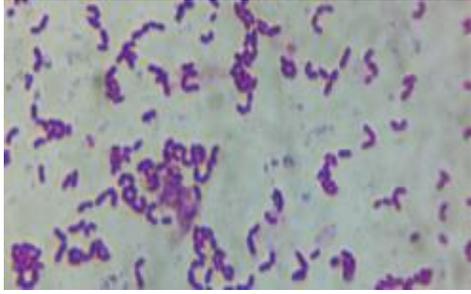
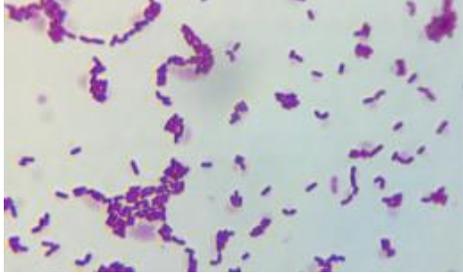
Les Annexes

E11		
E12		
E13		
E14		
E15		

Les Annexes

E16		
E17		
E19		
E20		
E21		

Les Annexes

E25		
E28		
E30		

Les Annexes

Annexe 4 : les figures

Figure 1 : La coloration de Gram. (Lionel, 2015)

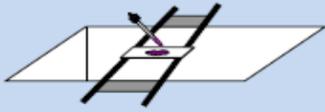
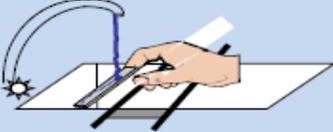
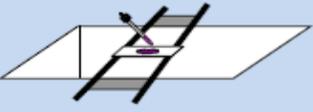
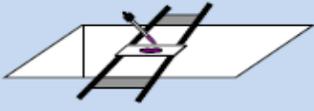
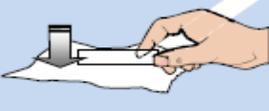
 <p>1. Couvrir le frottis bactérien de cristal violet (colorant primaire); attendre 1 minute.</p>	 <p>2. Rincer avec un mince filet d'eau ; faire «tomber» l'eau un peu au-dessus du frottis et non directement dessus.</p>	 <p>3. Mettre l'eau iodée (lugol) ; attendre 1 minutes.</p>
 <p>4. Rincer avec un mince filet d'eau.</p>	 <p>5. Décolorer en couvrant d'alcool ; attendre 30 sec.</p>	 <p>6. Rincer avec un mince filet d'eau.</p>
 <p>7. Couvrir de fuchsin de Ziehl (colorant secondaire) ; attendre 1 minute.</p>	 <p>8. Rincer avec un mince filet d'eau.</p>	 <p>9. Assécher doucement la lame : égoutter et essuyer le dessous de la lame à l'aide d'un papier à lentille.</p>
10. Observer la lame à l'huile à immersion (G : 100 . X)		

Figure : les étapes de la coloration de Gram



Exemples de diamètres d'inhibition autour de la fosfomycine pour *Escherichia coli*

a-c) ignorer les colonies dans la zone d'inhibition et lire le diamètre externe.

d) rapporter comme absence de diamètre d'inhibition.

Résumé

Au cours de cette étude, dix-huit souches de bactéries lactiques de genre *Lactobacillus* ont été isolées à partir des selles d'enfants sains et malades et identifiées selon les critères morphologiques et physiologiques.

Ces souches lactiques ont été testées sur quatorze souches pathogènes de type *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, isolées dans un laboratoire d'analyse bactériologique dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur de ces bactéries par le test des spots. Le test des spots a révélé une activité antibactérienne de ces souches à l'égard de toutes les souches cibles (sensibles et résistantes, Gram positif et négatif). Cette activité inhibitrice est probablement due à la synthèse de substances inhibitrices par les souches lactiques telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines, connues par leur pouvoir antagoniste contre de nombreuses bactéries pathogènes.

Les résultats obtenus suggèrent l'utilisation de ces dernières comme traitement curatif ou préventif des infections bactériennes.

Mots clés : Bactéries multi-résistantes, antagonisme, bactéries lactiques, selles, bactérie pathogène, *Lactobacillus*.

Abstract

In this study, eighteen strains of lactic acid bacteria of *Lactobacillus* were isolated from the faeces of healthy and sick children. The identification of these strains was based on morphological and physiological criterion.

These lactic bacteria strains were tested on fourteen multi-resistant and sensitive pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*), they were isolated in a bacteriological analysis laboratory in order to show the inhibitory effect of these bacteria by using the spot test. The results of the test revealed that all the isolated lactic strains have an inhibitory effect against both multi-resistant and sensitive pathogenic strains tested. This activity is probably due to the synthesis of inhibiting substances by lactic strains such as organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl and bacteriocins.

The results obtained suggest the use of lactic bacteria as curative or preventive treatment of bacterial infections.

Key words: Multi-resistant bacteria, antagonism, lactic acid bacteria, faeces, pathogenic strains, *Lactobacillus*.

ملخص

في هذه الدراسة، تم عزل ثمانية عشر سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك من نوع *Lactobacillus* من براز أطفال أصحاء ومرضى والتي تم تحديدها على أساس معايير مورفولوجية وفسولوجية.

السلالات الثمانية عشر قد تم اختبارها على أربعة عشر سلالة بكتيرية مسببة للأمراض، حساسة منها ومقاومة للمضادات الحيوية من نوع *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus*.

تم عزلها في مخبر التحاليل الطبية من أجل إظهار التأثير المثبط لهذه البكتيريا عن طريق اختبار البقعة أو (Spot). كشف اختبار البقعة عن النشاط المضاد للبكتيريا لهذه السلالات ضد البكتيريا الضارة المستهدفة (الحساسية والمقاومة، ذات الجرام الموجب والسالب).

ربما يرجع هذا النشاط المثبط إلى إنتاج مواد مثبطة من طرف سلالات حمض اللاكتيك مثل الأحماض العضوية، بيروكسيد الهيدروجين، ثاني أكسيد الكربون، ثنائي الأستيل و البكتريوسين، والمعروف عن قوتهم المضادة ضد العديد من البكتيريا المسببة للأمراض.

النتائج التي تم الحصول عليها تقترح إمكانية استخدام هذه المواد المثبطة كعلاج ضد الالتهابات البكتيرية.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المقاومة للمضادات، التأثير ضد الميكروبات، بكتيريا حمض اللاكتيك، بكتيريا ضارة، براز الأطفال، *Lactobacillus*.