

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire Santé



Réf

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude de l'activité anti-*Staphylococcus aureus* de souches de bactéries lactiques isolées de quelques produits laitiers fabriqués artisanalement

Présenté par :

Bekka Saliha & Benmaouche Celia

Soutenu le : 19 juin 2017

Devant le jury composé de :

M^{elle} BENDALI F.

MCA

Présidente

M^{me} TETILI F.

MAA

Promotrice

M^{me} BENACHOUR K.

MAA

Examinatrice

Année universitaire: 2016/2017



Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant qui nous a accordé le courage, la santé, la volonté, la patience et guidé à réaliser ce modeste travail.

Même si parfois les mots semblent fades à coté de la profondeur des sentiments, il faut pourtant les concrétiser en remerciement, pour honorer tous ceux qui nous ont aidé à franchir ce pat, vers l'avenir.

*Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme TETILI J**, pour son aide précieuse, ses orientations et le temps qu'elle a accordé pour notre encadrement.*

Nos remerciements les plus sincères à tous les membres de jury qui ont accepté de lire et examiner notre travail.

Enfin, nous remercions particulièrement nos parents, pour leurs soutiens inconditionnels tout au long de ces années d'études.

A vous tous, un grand merci



Dédicaces

*J'ai l'honneur et le grand plaisir de dédier ce modeste travail à :
Mes très chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leur
encouragements, par leurs sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont
toujours aimé me voire réussir.*

Mes très chers grands parents Maternels et ma chère grand-mère paternelle.

Ma chère sœur Sonia et son époux Hakim et leurs enfants : Amir et Yara.

Ma chère sœur Samira et son époux Sabri et leur petite fille Ibtissem.

Mon cher frère : Sofiane et son épouse Kahina.

Mes chers frères : Mohamed et Samir.

Ma chère sœur Sana.

Mes oncles, mes tantes, cousins et cousines.

Mon binôme Saliha ainsi que toute sa famille.

Tout (es) mes amis (es) sans exception.

Tout (es) les étudiants (es) de la promotion MAS 2016/2017.

En fin, à tous ceux que j'aime, et qui m'aiment.

Celia

Dédicaces



*J'ai l'honneur et le grand plaisir de dédier ce modeste travail à :
La mémoire de mon cher père qui a gardé une place dans mon cœur, que Dieu l'accueille dans
son vaste paradis.*

*Ma très chère mère qui m'a éclairé le chemin de la vie par son grand soutien et ses
encouragements, par son sacrifice qu'elle m'a consenti durant mes études et qui a toujours
aimé me voir réussir.*

Mon cher frère : Djamel et son épouse Sissa et leur fils Hocine

Mes chers frères : Hamid, Abdenour et Nacer.

Ma chère sœur Noura et son époux Mokhtar.

Ma chère sœur Karima et son époux Kamel et leurs enfants : Sara , Meriem et Abdrahman

Mes chères sœurs Farida et Fatiha.

Mes oncles, mes tantes, cousins et cousines.

Mon binôme Celia ainsi que toute sa famille.

Tout (es) mes amis (es) sans exception.

Tout (es) les étudiants (es) de la promotion MAS 2016/2017.

En fin, à tous ceux que j'aime, et qui m'aiment.



Saliha

Liste des abréviations

- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- ARNr16S:** Acide ribonucléique ribosomique 16S
- ATP :** Adénosine triphosphate
- Aw :** Activité of water
- BHIB :** Brain Heart Infusion Broth
- BN:** Bouillon nutritif
- °C :** Celsius
- C+G:** Cytosine + Guanine
- FAO:** Food and Agriculture Organization
- L :*** *Listeria*
- Lb:*** *Lactobacillus*
- Lc :*** *Lactococcus*
- MH:** Mueller Hinton
- MRS :** Man Rogosa et Sharpe
- OMS:** Organisation Mondiale de la Santé
- pH:** Potentiel d'hydrogène
- pKa:** Constante d'acidité
- ppm :** Partie par million
- S :** Souche
- S. aureus :*** *Stapylococcus aureus*
- TSST-1 :** Toxine-1 syndrome de choc toxique
- UFC:** Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse comparative des séquences de l'ARNr 16S	3
Figure 2 : Action des acides organiques sur la cellule cible	4
Figure 3 : Mode d'action des bactériocines	8
Figure 4 : Structure de <i>S.aureus</i>	10
Figure 5: Standardisation des inocula des bactéries lactiques et pathogènes	16
Figure 6: Schéma illustrant les étapes de réalisation du test des spots	18
Figure 7: Etapes de réalisation du test des puits	19
Figure 8 : Technique d'antagonisme en microplaque	20
Figure 9 : Etapes de réalisation du test d'antagonisme dans le lait	22
Figure 10 : Aspect des bactéries lactiques sur gélose MRS.....	23
Figure 11 : Aspect des bactéries lactiques sur bouillon MRS.....	23
Figure 12 : Aspect microscopique d'une souche de bactérie lactique sous microscope optique.....	24
Figure 13 : Résultats obtenus par la méthode des spots vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	26
Figure14 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition exprimées en millimètres obtenus pour chaque souche par le test des spots	27
Figure 15 : Résultats obtenus par la méthode des puits avec les surnageants natifs vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	28
Figure 16 : Résultats de l'effet des surnageants des souches lactiques vis-à-vis de souches de <i>S. aureus</i>	29
Figure 17 : Résultats de l'étude de l'antagonisme dans le lait	30

Liste des tableaux

Tableau I : Les principaux effets bénéfiques attribuée aux probiotiques	4
Tableau II : Origine des souches de bactéries lactiques utilisées	13
Tableau III: Les souches cibles utilisées et leur origine	14
Tableau IV: Résultats des aspects macroscopique et microscopique des souches de <i>S. aureus</i>	25
Tableau V : Résultats de la standardisation des inocula lactiques et pathogènes dans bouillon MRS et lait écrémé stérile.	26

Liste des tableaux en annexes

Annexe I. Données bibliographiques

Tableau I : Classification des bactériocines.

Tableau II : Conditions requises pour la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines.

Annexe II. Résultats

Tableau I : Résultats du Test des spots à l'égard de StLb2, St2 et St5.

Tableau II : Résultat de l'étude de l'antagonisme dans le lait (log N (UFC/ ml)).

Tableau III : Résultat de l'antagonisme en microplaque à l'égard de St2, StLb2 et St5.

Annexe III. Composition des milieux de culture utilisés

Tableau I : Gélose Mueller Hinton.

Tableau II : Bouillon et gélose MRS.

Tableau III : Bouillon et gélose nutritive.

Tableau IV : Gélose Chapman.

Tableau V : Bouillon BHI

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Patrie bibliographique

I : Les bactéries lactiques

I.1. Définition et caractères généraux	2
I.2. Taxonomie et classification	2
I.3. Propriétés	3
I.3.1. Propriétés probiotiques	3
I.3.2. Propriétés antimicrobiennes	4

II : *Staphylococcus aureus*

II.1. Caractères généraux	10
II.2. Facteurs de virulence	10
II.3. Pathogénicité	11
II.4. Contrôle de la virulence et de la croissance de <i>S. aureus</i> dans les aliments.....	11

Partie pratique

I : Matériel et méthodes

I.1 Origine des souches utilisées	13
I.1.1 Souches test	13
I.1.2. Souches cibles	13
I.2. Revivification et vérification de la pureté des souches.....	14
I.3. Standardisation des inocula bactériens	14
I.4. Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques.....	17

I.4.1. Test des spots (antagonisme direct)	17
I.4.2. Test des puits (antagonisme indirect)	19
I.4.3. Méthode des microplaques.....	20
I.4.4. Test d'antagonisme dans le lait.....	21

II : Résultats et discussion

II.1. Les souches lactiques.....	23
II.1.1 Aspect macroscopique	23
II.1.2 Test de la catalase	24
II.1.3 Aspect microscopique.....	24
II.2. Les souches pathogènes.....	24
II.3. Résultats de la standardisation des inocula.....	26
II.4 Mise en évidence de l'activité anti <i>S.aureus</i>	26
II.4. 1. Test des spots.....	26
II.4.2. Test des puits	28
II.4.3. Antagonisme en microplaque	29
II.4.4. Etude de l'antagonisme dans le lait	30
Conclusion	32

Références bibliographiques

Annexes



Introduction

Introduction

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxications alimentaires, c'est pourquoi les antibiotiques ont été utilisés pour les éliminer. Ceci a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont orientées vers la recherche des substances naturelles (**Ababsa, 2012**).

Les produits laitiers sont généralement contaminés par des bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus*. L'origine de ces contaminations varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait cru et des produits laitiers par *S. aureus* peut être d'origine endogène, tel qu'une mammite ou inflammation des glandes mammaires de ruminant peut conduire au transfert de *S. aureus* dans le lait cru. Elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (**Brisabois et al., 1997**). Leur présence dans le lait et les produits laitiers peut causer des intoxications alimentaires et des toxi-infections plus ou moins sévères. Certaines souches appartenant principalement à l'espèce *S. aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxi-infection alimentaire (**Le Loir et Gantier, 2009**). Il est donc nécessaire d'assainir biologiquement les produits alimentaires et surtout laitiers par l'ajout de souches lactiques ou de leurs bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Plusieurs microorganismes ont été découverts dans un contexte de santé humaine ou de sécurité sanitaire des aliments. L'inhibition des agents pathogènes par les bactéries lactiques dans les produits laitiers et d'autres aliments fermentés, a été particulièrement explorée. Ces études ont fréquemment eu pour objet l'inhibition de *S. aureus*. Divers mécanismes d'inhibition ont été identifiés (**Charlier et al., 2009**). La bioconservation des aliments, est due aux pouvoirs antagonistes des bactéries lactiques. En effet, elles ont la particularité de synthétiser des substances inhibitrices, principalement les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Zagorec et Christieans, 2013**).

L'objectif de ce travail consiste à sélectionner des souches de bactéries lactiques qui sont capables d'exercer une activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches de *S. aureus*.

Ce travail comportera deux parties, dont une synthèse bibliographique qui consiste à rappeler les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques et des généralités sur *S. aureus*. Une partie pratique qui présente les différents tests réalisés et les résultats obtenus.



**Synthèse
bibliographique**

I.1 Définition et caractères généraux

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919). Ce sont des cellules hétérotrophes et chimioorganotrophes. Du point de vue morphologique, elles peuvent être réparties en trois groupes : les coques, les bâtonnets réguliers et les bâtonnets irréguliers (**Dellaglio et al., 1994**). Elles regroupent des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 55%. Ces bactéries sont asporulantes, aéro-anaérobies facultatives, acido-tolérantes et capables de croître entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 4,5, généralement immobiles, ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (**Pilet et al., 2005**).

Ces bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en glucides fermentescibles et en acides gras, acides aminés, peptides, vitamines et en sels (**Dellaglio et al., 1994 ; Shleifer, 2009**).

En se basant sur les produits fabriqués à partir de la fermentation du glucose, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes, homofermentaire et hétérofermentaire :

- Homofermentaire : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- Hétérofermentaire : la fermentation du glucose aboutit à la formation de l'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques (**Pilet et al., 2005**).

En général, les bactéries lactiques sont ubiquistes, et on les trouve dans différentes niches écologiques comme les produits laitiers, les végétaux, la viande et dans le tractus digestif (**Drouault et Corthier, 2001**).

I.2 Taxonomie et classification

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures et la tolérance aux pH (**König et Fröhlich, 2009**).

La relation phylogénétique entre les différents genres des bactéries lactiques est représentée dans la (figure 1). Elle est basée sur la comparaison des séquences d'ARN16 S. Les genres *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Latosphaera*, et *Melissococcus*, sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct (**Holzappel et al., 2001**).

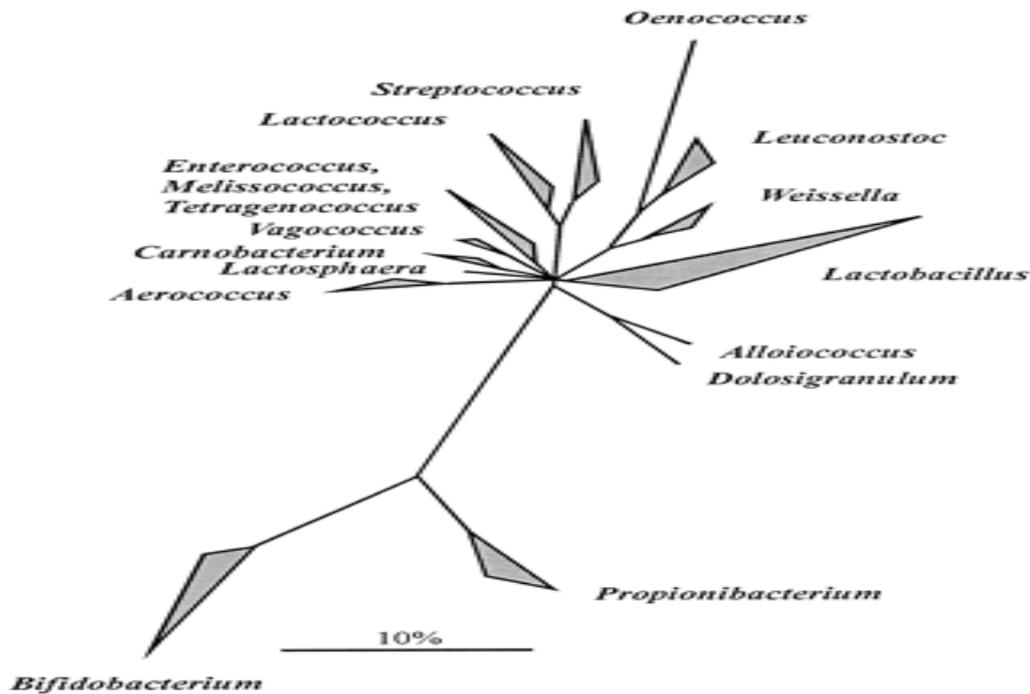


Figure 1: Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S (Holzapfel et al., 2001).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API50CH (Curk et al., 1993).

Selon *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles. (*Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*) (Ludwig et al., 2009).

I.3 Propriétés

I.3.1 Propriétés probiotiques

❖ Définition des probiotiques

La définition des «probiotiques» est celle adoptée par le comité mixte d'experts de la FAO et l'OMS qui les définit comme « des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates confèrent un avantage pour la santé de l'hôte » (Hill et al., 2014). Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. Le tableau I illustre certains effets bénéfiques sur la santé humaine.

Tableau I : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
Contrôle des troubles suivants: - Mauvaise digestion du Lactose. - Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée-associée aux antibiotiques. - Syndrome du côlon irritable. - Constipation.	- Modulation immunitaire. - Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>).	Réduction du risque de : - Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein). - Réduction du cholestérol sérique.

I.3.2 Propriétés antimicrobiennes

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites à effet antimicrobien tels que les acides organiques, le dioxyde de carbone, le diacetyl, le peroxyde d'hydrogène, les acides gras, la reutérine et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009 ; Suskovic et al., 2010).

A. Acides organiques

L'effet antimicrobien des acides organiques réside dans la réduction du pH (Yang, 2000). Sous leur forme indissociée, ils traversent facilement la membrane cytoplasmique, et se dissocient à l'intérieur de la cellule (figure 2). Le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées (Piard et Desmazeaud, 1991).

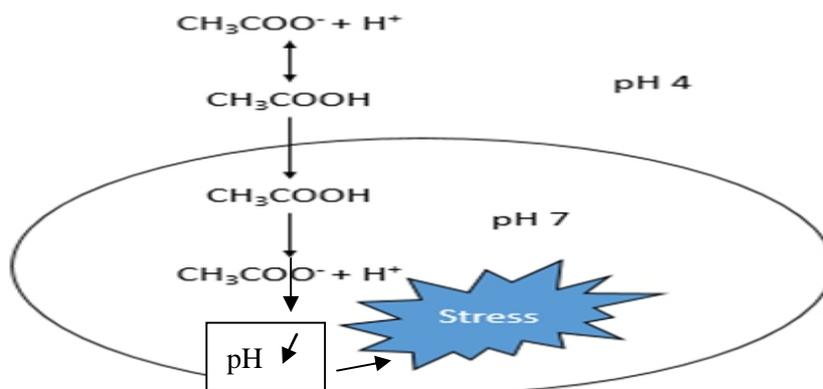


Figure 2 : Action des acides organiques sur la cellule cible (Beales, 2004).

En plus de l'effet du pH, l'acide indissocié fait chuter le gradient électrochimique de proton, entraînant la bactériolyse et finalement la mort de la bactérie cible (**Schnurer et Magnusson, 2005**).

Cette baisse de pH va aussi favoriser l'oxydation des lipides, modifiant ainsi leur état d'ionisation. Le même phénomène est observé pour les protéines, pour lesquelles une baisse de pH va entraîner une augmentation des charges positives, donc une modification de leur état d'ionisation qui va modifier leur configuration spatiale et altérer leur fonctionnalité. Cette modification de l'état d'ionisation va également perturber la transcription des gènes. Au bas pH, l'ADN lui-même est fragmenté par altération des bases puriques et pyrimidiques.

En effet, l'acide acétique produit à faible échelle lors de la fermentation peut interagir avec les membranes cellulaires pour causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique. Son activité antimicrobienne est plus efficace que celle de l'acide lactique, étant donné sa plus grande valeur de pKa (acide lactique 3,08 et acide acétique 4,75) et son grand pourcentage en formes non dissociées par rapport à l'acide lactique à un pH donné. L'acide acétique est plus inhibiteur de *Listeria monocytogenes* que l'acide lactique, car ce dernier, en abaissant le pH du milieu, favorise l'augmentation de la toxicité de l'acide acétique. Ils agissent donc de façon synergique (**Private et Thonart, 2011**).

B. Dioxyde de carbone (CO₂)

Le dioxyde de carbone est produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Le mécanisme de son action antimicrobienne est méconnu. Cependant, le CO₂ peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique. L'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique de la membrane peut entraîner un dysfonctionnement de la perméabilité. Le CO₂ peut inhiber efficacement la croissance de nombreux microorganismes d'altération des aliments, en particulier des bactéries psychrotrophes Gram négatives (**Yang, 2000 ; Ammor et al., 2006**). Le degré d'inhibition de CO₂ varie considérablement entre les organismes. Le CO₂ à 10% pourrait réduire le nombre de bactéries totale par 50% et avait une forte activité antifongique (**Ammor et al., 2006**).

C. Reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne produite par *Lb. reuteri* (**Axelsson et al., 1989**). Elle est synthétisée comme un métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol (**Piard et Desmazeaud, 1992**).

La reutérine soluble dans l'eau, résiste aux enzymes protéolytiques et lipolytiques et elle est stable sur une large gamme de pH (**Rodriguez et al., 2003**). Elle a une action contre les procaryotes (à Gram positif ou à Gram négatif), les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (**Vollenweider, 2004**).

D. Diacétyl

Le diacétyl est un produit issu du métabolisme du citrate (**Ammor et al., 2006**). L'effet antimicrobien du diacétyl a été connu depuis les années 1930. Il inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif en réagissant avec une protéine fixatrice d'arginine (**Yang, 2000**). Les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles au diacétyl que celles à Gram positif (**Jay, 1982**).

E. Acétaldéhyde

L'acétaldéhyde est un composé aromatique volatil présent dans de nombreux aliments fermentés (**Osborne et al., 2000**). Chez *Lb. delbrukii ssp bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, et *Escherichia coli* dans les produits laitiers (**Piard et Desmazeaud, 1991**).

La contribution de l'acétaldéhyde à la bioconservation est mineur puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des micro-organismes (**Kulshrestha et Marth, 1974**).

F. Acide gras

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possèdent des activités lipolytiques pouvant produire des quantités significatives d'acides gras. Par exemple, dans la fermentation du lait fermenté, les acides gras insaturés sont actifs contre les bactéries à Gram positif et peuvent présenter une activité antifongique dépendante de la longueur des ramifications, la concentration et le pH de milieu (**Yang, 2000**).

G. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles (**Dellaglio et al., 1994**). Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène sous l'action de flavoprotéines oxydases (**Ammor et al., 2006**).

L'effet antimicrobien de H₂O₂ peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydriles causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes et de la peroxydation des lipides de la

membrane, de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane. Le H_2O_2 peut également agir comme précurseur pour la production des radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O_2^*) et les radicaux d'hydrogène (OH) qui peuvent endommager l'ADN (Ammor *et al.*, 2006).

Dans le lait cru, le H_2O_2 active le système de lactopéroxydase produisant de hypothiocyanate (OSCN⁻), des oxyacides plus élevés (O_2SCN^- et O_3SCN^-) et produits intermédiaires d'oxydation qui sont inhibiteurs à une gamme étendue de bactérie à Gram positif et à Gram négatif (Yang, 2000).

H. Bactériocines

❖ Définitions

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009). Elles sont généralement thermorésistantes, actives uniquement sur des bactéries à Gram positif, avec un spectre d'activité étroit (Pilet *et al.*, 2005).

Ces substances protéiques sont synthétisées par une voie ribosomique et douée d'une activité bactéricide ou bactériostatique. Parmi leur caractéristiques communes, on peut noter que ces molécules sont synthétisées au sein de la cellule sous la forme d'un précurseur et subissent un processus de maturation au cours de leur export vers le milieu extracellulaire (Cenatiempo *et al.*, 1996). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leur propres bactériocines par une ou plusieurs protéines d'immunité (Ammor *et al.*, 2006).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (Dortu et Thonart, 2009).

❖ Classification

La classification de Klaenhammer (1993) comprend quatre classes de bactériocines. Cotter *et al.* (2005) suggèrent une nouvelle classification où les bactériocines sont divisées en deux catégories. Enfin, Drider *et al.* (2006) ont divisé les bactériocines en trois classes principales en fonction de leurs caractéristiques génétiques et biochimiques (Balciunas *et al.*, 2013). Ces classes sont présentées dans le tableau I (Annexe I).

❖ **Mode d'action des bactériocines**

Les bactériocines présentent des modes d'action similaires. En effet un pore dans la membrane de la cellule cible, occasionne une perméabilité de celle-ci et donc une dissipation de la force proton motrice, entraînant la mort cellulaire (Cenatiempo *et al.*, 1996 ; Privat et Thonart, 2011) (Figure 3).

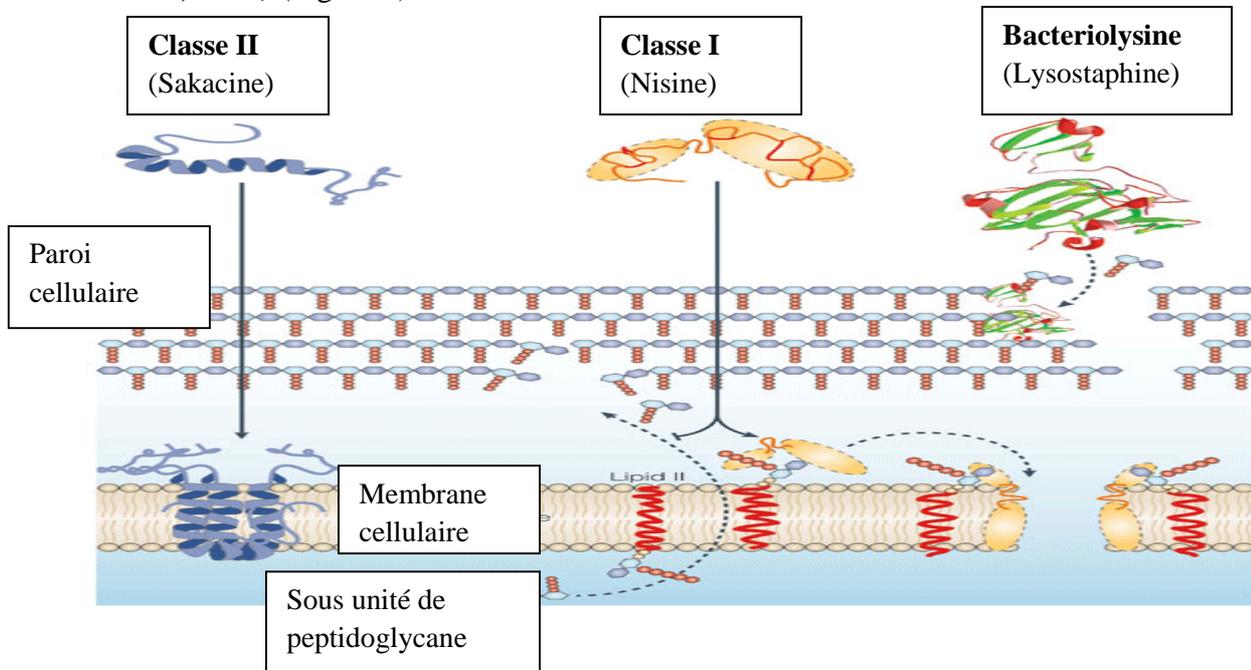


Figure 3 : Mode d'action des bactériocines (Cotter, 2005).

✓ **Classe I (les lantibiotiques)**

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, ... (Dortu et Thonart, 2009).

✓ **Classe II**

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Dortu et Thonart, 2009).

✓ Classe III

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocine A et la millericine B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles (**Dortu et Thonart, 2009**).

❖ Application des bactériocines

- Dans le secteur alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires a connu une forte progression. Du fait que ces substances sont naturelles, sûres (non toxiques pour les cellules eucaryotes et facilement digestibles dans le tractus intestinal), tolérantes aux traitements thermiques et aux variations du pH et agissant à de faibles concentrations. Leur application conduit à une prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (**Gautam et Sharm, 2009**).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine), soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *in situ*), comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption (**Dortu et Thonart, 2009**).

- Dans le secteur sanitaire

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternative aux antibiotiques (**Smaoui, 2010**).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptide antimicrobien qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* et *L. monocytogenes* (**Dridier et al., 2006**).

II.1. Caractères généraux

A la coloration de Gram, *S. aureus* apparaît sous forme de coques à Gram positif de 0,5 à 1,0 μm de diamètre, associés par paire, en chainettes de 3 à 5 coques, ou en amas irréguliers en grappes de raisins. C'est une bactérie mésophile et de type respiratoire aero-anaérobie facultatif, immobile et non sporulée, à oxydase négative et catalase positive (De Buyser et Sutrat, 2005). *S. aureus* se cultive à des températures comprises entre 6 °C et 46 °C (température optimale : 37 °C), à un pH compris entre 4 et 9,8 (pH optimum : 6 à 7). Cette espèce tolère une concentration élevée de NaCl (jusqu'à 20 %) et une Aw très réduite (0,83) (Brisabois et al., 1997).

II.2. Facteurs de virulence

La virulence des souches de *S. aureus* impliquées dans des infections humaines ou animales est liée à la production d'une grande variété de composés, qui sont soit associés à la paroi de la bactérie (adhésines telle que la protéine A), soit excrétés dans l'environnement de la bactérie (toxines, coagulase, enzymes) (Figure 4).

Au regard des facteurs de virulence mis en jeu, les infections staphylococciques peuvent être classées en deux catégories :

- Les pathologies dues à la production par la souche infectante de plusieurs facteurs de virulence. C'est le cas des infections cutanées, des septicémies et des infections viscérales chez l'Homme ou les infections animales.
- Les pathologies dont les symptômes sont dus exclusivement ou de manière prépondérante à un seul type de toxine. C'est le cas des toxi-infections alimentaires dues à des entérotoxines staphylococciques (De Buyser et Sutrat, 2005).

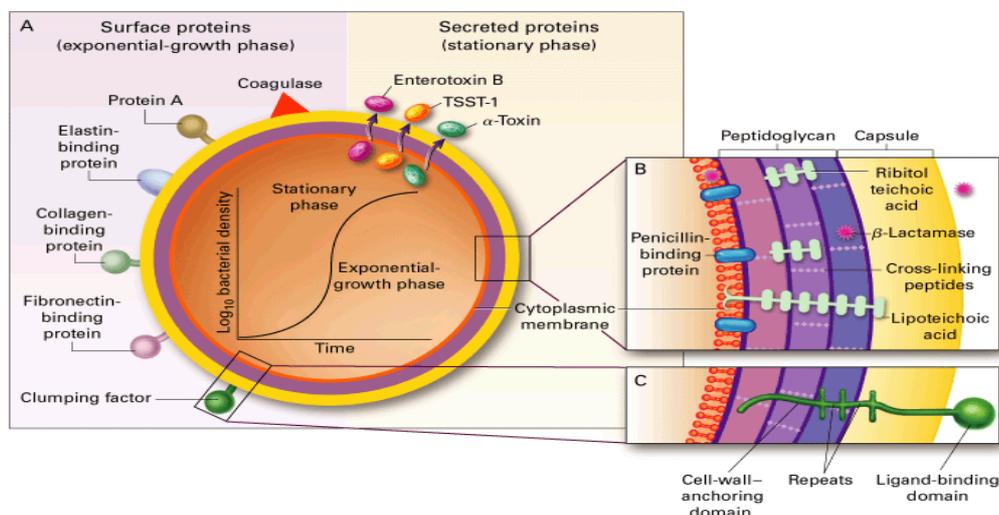


Figure 4 : Structure de *S. aureus* (Patel et al., 2012).

II.3. Pathogénicité

La pathogénicité de *S. aureus* dépend de la production des protéines de surface qui médient l'adhésion bactérienne aux tissus de l'hôte. La sécrétion d'une série de toxines extracellulaires et d'enzymes qui vont détruire les cellules et les tissus hôtes. Les toxines sont des protéines sécrétées par *S. aureus* dans la matrice extracellulaire pendant les phases post-exponentielles et stationnaires. Ces protéines sont habituellement impliquées dans la pénétration des tissus et permettent aux bactéries d'envahir son hôte. Parmi les toxines les plus courantes sécrétées par *S. aureus* figurent l'hémolysine, l'entérotoxine et la toxine-1 syndrome de choc toxique (TSST-1) (Kong et al., 2016).

❖ Pathogénicité due aux Entérotoxines staphylococciques

La présence des staphylocoques dans les aliments représente un risque pour la santé humaine, parce que certaines souches appartenant principalement à l'espèce *S. aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxiinfection alimentaire à staphylocoque. Le lait et les produits laitiers ne deviennent toxiques que s'ils sont contaminés par des souches productrices d'entérotoxines. Ces entérotoxines peuvent être détectées quand le nombre de *S. aureus* atteint environ 10^6 à 10^7 UFC/g (Brisabois et al., 1997). La production d'entérotoxines par cette bactérie est dépendante des conditions environnementales (Hennekinne et al., 2012) (Tableau II, Annexe I).

II.4. Contrôle de la virulence et de la croissance de *S. aureus* dans les aliments

Au niveau alimentaire, ce sont les entérotoxines produites par *S. aureus* qui sont réellement problématiques et non la bactérie elle-même. En effet, les cellules de *S. aureus* ne résistent ni aux traitements stérilisants de l'industrie agroalimentaire, notamment les traitements thermiques, ni à l'acidité et aux diverses enzymes du système digestif humain. En revanche, les toxines staphylococciques sont très résistantes aux traitements thermiques.

L'entérotoxine A, peut résister plus d'une heure à 100°C et plus de 12 h à des concentrations élevées en trypsine et en pepsine *in vitro* (Li et al., 2011). Ces traitements entraînent néanmoins une diminution de l'activité sérologique de l'entérotoxine A. Après une pasteurisation classique (72°C, 15 secondes), les activités sérologiques de l'entérotoxine A et de l'entérotoxine D sont encore respectivement mesurées à 36% et 30% dans le lait entier, 56% et 30% dans le lait écrémé et 24% et 15% dans la crème. De manière générale, la plupart

des entérotoxines résistent aux enzymes protéolytiques du système digestif humain (**Hennekinne et al., 2012**). Du fait de cette forte stabilité des toxines staphylococciques, l'empêchement de leur production par *S. aureus* durant la fabrication et la conservation des aliments représente un enjeu majeur de santé publique.



**Matériel et
méthodes**

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie 1 (bloc 9) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Abderrahmane Mira-Bejaia. Il s'est déroulé en trois mois (du mois de Mars au mois de Mai 2017).

Cette étude consiste à l'étude de l'activité antibactérienne de quelques souches lactiques isolées à partir de produits laitiers traditionnels à l'égard des souches pathogènes de *S. aureus*.

I.1. Origine des souches utilisées

Afin d'étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques isolées de quelques produits laitiers fabriqués artisanalement, six souches de bactéries lactiques et trois souches de bactéries pathogènes (*S. aureus*) sont utilisées.

I.1.1. Souches test

Les souches de bactéries lactiques sont déjà isolées et conservées à -18°C dans le lait écrémé et le bouillon MRS (Biokar, France) additionnés de 30% de glycérol. Le tableau suivant II présente l'origine des souches lactiques utilisées.

Tableau II : Origine des souches de bactéries lactiques utilisées

Souche	Formes	Produit d'isolement	Région
S6	Bacille	Lben	Tizi (Béjaia)
S7	Bacille	Beurre	Tizi (Béjaia)
S10	Bacille	Lben	Ihaddaden (Bejaia)
S16	Cocci	Lben	Ihaddaden (Bejaia)
S17	Bacille	Lben	Ihaddaden (Bejaia)
S31	Bacille	Lben	Ihaddaden (Bejaia)

I.1.2. Souches cibles

Les souches pathogènes sont déjà isolées et conservées à 4 °C sur gélose nutritive. Le tableau III, présente les souches cibles utilisées.

Tableau III : Les souches cibles utilisées et leur origine.

Souches	Echantillon d'isolement	Région
<i>Staphylococcus aureus</i> 2 (St2)	Lait cru	Ihaddaden (Bejaia)
<i>Staphylococcus aureus</i> 5 (St5)	Lait cru	Ihaddaden (Bejaia)
<i>Staphylococcus aureus</i> (StLb2)	Lben	Amizour (Bejaia)

I.2. Revivification et vérification de la pureté des souches

La revivification des souches test et cibles consiste à leur repiquage dans 9ml de bouillon MRS pour les souches lactiques et bouillon nutritif (Biokar, France) pour les souches cibles et leur incubation à 30°C /48h et 37°C/24h respectivement. La pureté des souches lactiques et pathogènes est vérifiée par :

❖ La coloration de Gram

L'examen microscopique est effectué sur un frottis bactérien, coloré par la méthode de Gram.

❖ Test de la catalase

La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame en verre sur laquelle une goutte de H₂O₂ (Theralab, Algérie) à 10 volumes est ajoutée. La présence de l'enzyme se manifeste par une effervescence (**Guiraud, 2003**).

I.3. Standardisation des inocula bactériens

Afin d'étudier l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes de *S. aureus*, les souches tests ainsi que les souches cibles sont standardisées comme suit (figure 5) :

- ❖ Quelques colonies sont cultivées dans des tubes contenant des bouillons MRS (souches lactiques) et nutritif (souches pathogènes) puis incubées à 30°C et 37°C respectivement pendant 24h. Par la suite, elles sont ensemencées sur des boîtes contenant des géloses MRS (Liofilchem, Italie) et nutritive (Conda, Espagne) suivi d'une incubation à 30°C (souches lactiques) et 37°C (souches pathogènes) pendant 24h.

- ❖ Après incubation, 4 colonies de souches tests et une colonie de souche cible sont mises dans 9ml de bouillon MRS et nutritif et l'incubation est réalisée à 30°C et 37°C respectivement pendant 18h.
- ❖ Ces cultures fraîches de 18h sont utilisées pour la préparation des dilutions jusqu'à 10⁻⁸ dans de l'eau physiologique, puis un ensemencement en masse est effectué à partir des deux dilutions 10⁻⁷ et 10⁻⁸, puis les boîtes sont incubées à 30°C et 37°C respectivement pour les souches tests et cibles pendant 24h.
- ❖ Après l'incubation, il est nécessaire de compter les colonies sur les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en UFC /ml et calculés à l'aide de la formule suivante (**Guiraud, 2003**) :

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Où :

Σ c: la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.

v: le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

n₁ : le nombre de boîtes retenues à la première dilution.

n₂ : le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution.

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Les mêmes étapes sont suivies pour la standardisation des souches dans le lait écrémé stérile (Lait UHT).

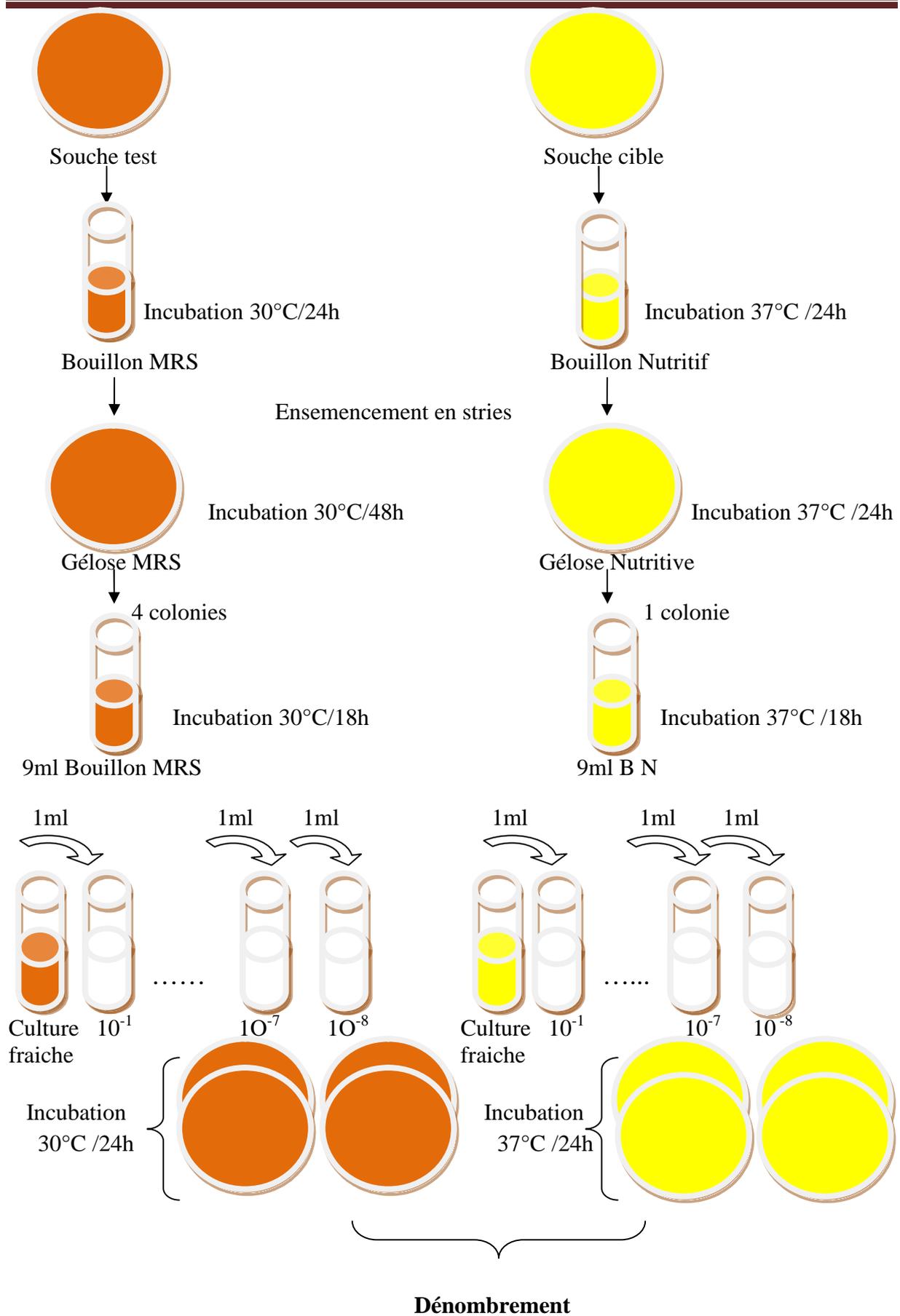


Figure 5 : Standardisation des inocula des bactéries lactiques et pathogènes.

I.4 Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques

I.4.1. Test des spots (Antagonisme direct)

Pour étudier l'activité antibactérienne des souches lactiques, la méthode décrite par Flaming *et al.* (1975) à été adoptée (**Schillinger et Lucke, 1989 ; Samot et badet, 2013**). L'activité antibactérienne des souches lactiques est évaluée contre les souches pathogènes de *S. aureus*.

Les souches lactiques à une charge de 10^8 UFC/ml sont mises en culture dans le bouillon MRS et après 18h d'incubation à 30°C, un volume de 5µl est déposé à la surface de la gélose MRS. Après séchage des spots pendant 30 min, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h. Après incubation, les géloses sont recouvertes avec 10ml de la gélose Mueller Hinton (MH) (Conda, Espagne) qui avait préalablement étéensemencée avec 1ml d'une culture de 18h de la souche cible (10^6 UFC/ml). L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. Une zone claire autour du spot de la souche lactique est considérée comme une inhibition positive (**Hernandez *et al.*, 2004**). Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm (figure 6). Ce test est réalisé avec 3 répétitions.

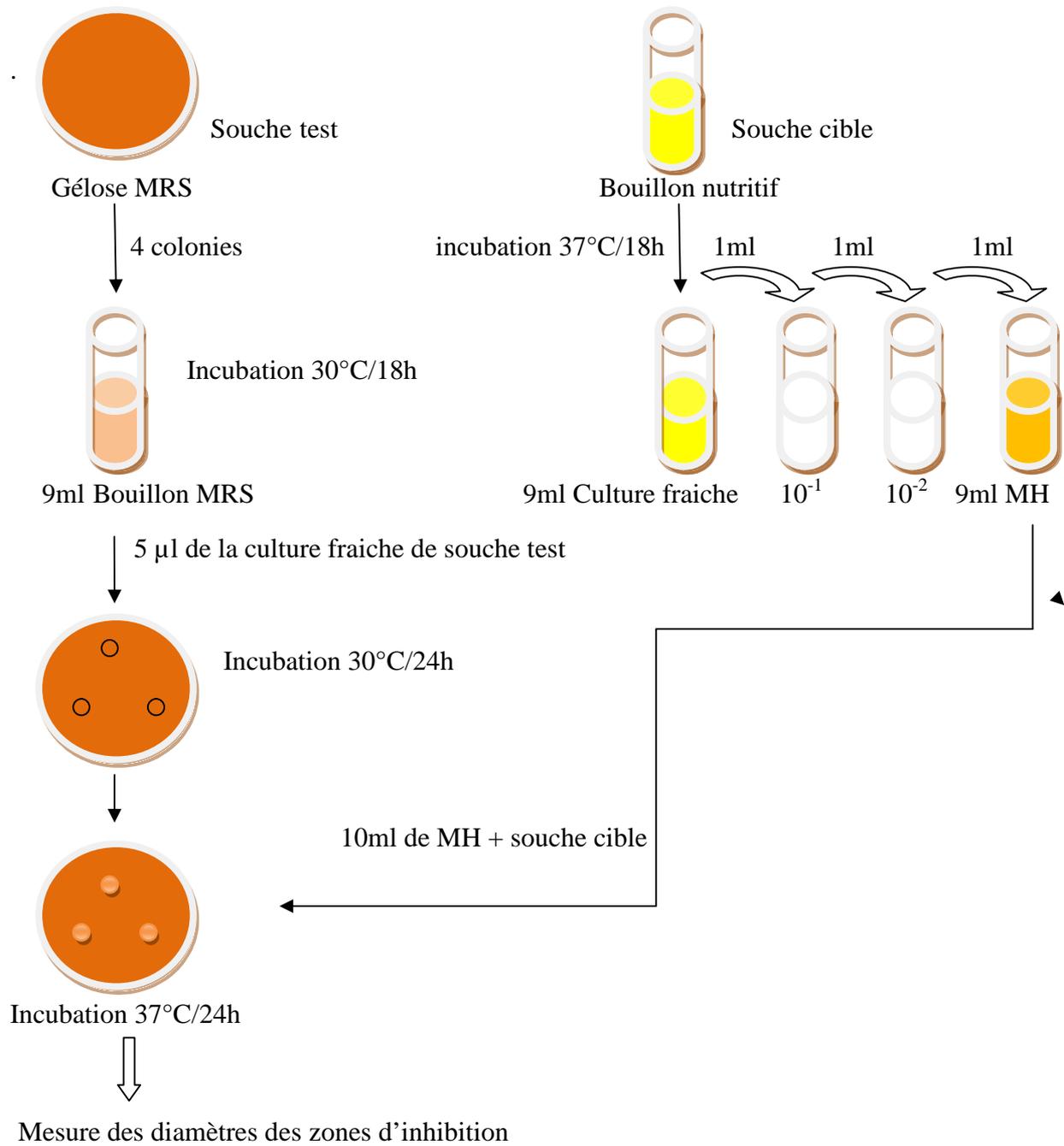


Figure 6 : Schéma illustrant les étapes de réalisation du test des spots.

I.4.2. Test des puits (Antagonisme indirect)

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne dans les surnageants des souches lactiques, la méthode de diffusion en puits est utilisée. Cette méthode de détection de l'antagonisme bactérien par des puits a été décrite par **Tagg et Mc Given (1971)** ; **Barfoot et Klaenhammer (1989)** et **Ennahar (1998)**. Les souches de bactéries lactiques (10^8 UFC/ml) sont cultivées dans le bouillon MRS et les souches pathogènes dans le bouillon nutritif 18h à 30°C et 37°C respectivement.

Pour la préparation des surnageants à tester, les cultures fraîches des souches de bactéries lactiques sont centrifugées à $5000g$ (ERA Belili Centrifuge, Chine) pendant 10min à 4°C . Des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés dans la gélose MH préalablement inoculée par la souche pathogène (10^6 UFC/ml). Les puits sont ensuite scellés puis remplis par $100\ \mu\text{l}$ du surnageant à tester. Un témoin négatif est aussi inclus dans ce test par le remplissage d'un puits par le bouillon MRS stérile. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes puis incubées à $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ (Figure 7). La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour des puits. Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2mm.

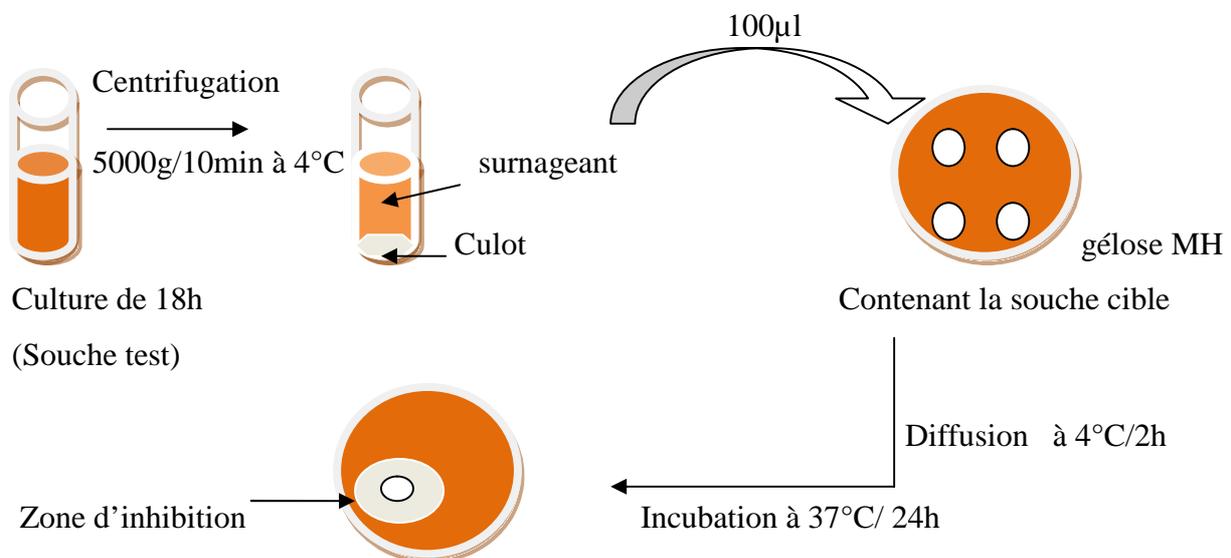


Figure 7 : Etapes de réalisation du test des puits.

I.4.3. Méthode des microplaques

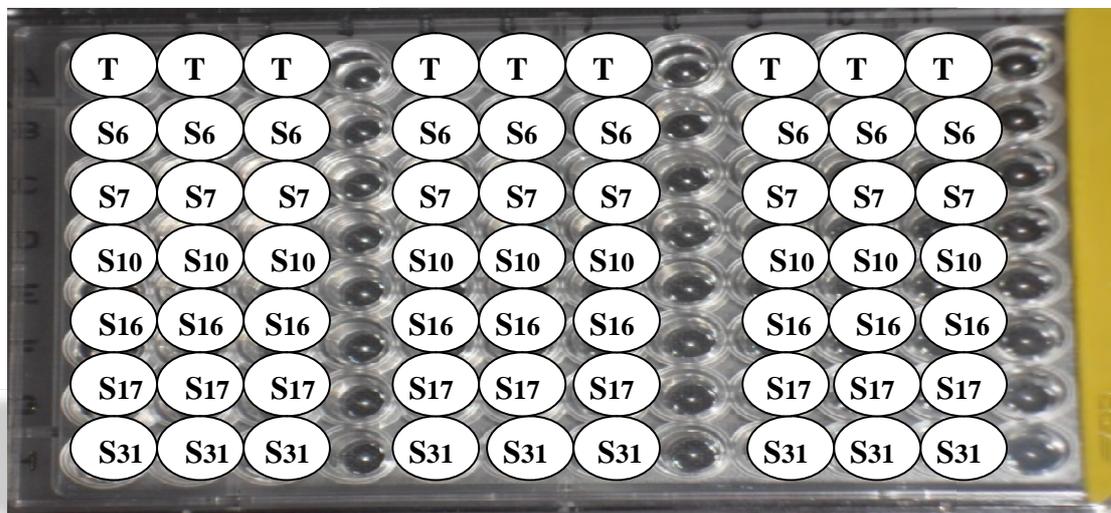
Afin de confirmer la présence ou l'absence des substances antibactériennes dans le surnageant des souches lactiques, la méthode d'antagonisme en microplaque est appliquée.

Cette méthode consiste à placer 25µl du surnageant de la souche lactique préalablement cultivée dans le BHIB dans les cupules d'une microplaque. Chaque cupule reçoit un volume de 175µl de bouillon BHIB inoculé par 1% (v/v) d'une préculture de la souche cible (10^6 UFC/ml). Après incubation à 37°C pendant 20h, la croissance est évaluée en mesurant la densité optique à 630nm (Simova *et al.*, 2009) (Figure 8).



25µl du surnageant de la souche test +

175µl de BHIB inoculé par 2µl de préculture de *S. aureus* (10^6 UFC/ml)



T : Témoin des souches de *S. aureus* pures
S : Surnageants des souches lactiques

Incubation 37°C/20h

Mesure de la densité optique à 630 nm

Figure 8: Technique d'antagonisme en microplaque.

I.4.4. Test d'antagonisme dans le lait

Dans le but d'évaluer le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques à l'égard des souches de *S. aureus* quand elles coexistent dans le lait ou un produit laitier, l'étude de l'antagonisme *in vitro* de la souche lactique (S16) à l'égard de la souche de *S. aureus* (St5) est effectuée en culture mixte et pure dans le lait écrémé stérile comme suit (Figure 9).

- ❖ Dans un flacon stérile, une culture pure de *S. aureus* est préparée dans un volume final de 100ml de lait écrémé à un taux de 10^3 UFC/ml. En parallèle, une culture mixte est préparée dans 100ml de lait écrémé à un taux de 10^8 UFC/ml et 10^3 UFC/ml de souche lactique et *S. aureus* respectivement.
- ❖ Après chaque intervalle de temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h), 1ml de chaque type de culture est prélevé, et une série de dilutions est réalisée. Un ensemencement de 1ml de la dilution convenable est ensemencé en masse dans de gélose Chapman.
- ❖ Les boîtes sont incubées à $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Au terme de la période d'incubation, les colonies sont comptées et leur nombre est exprimé en UFC/ml. Ce test est réalisé avec deux répétitions.

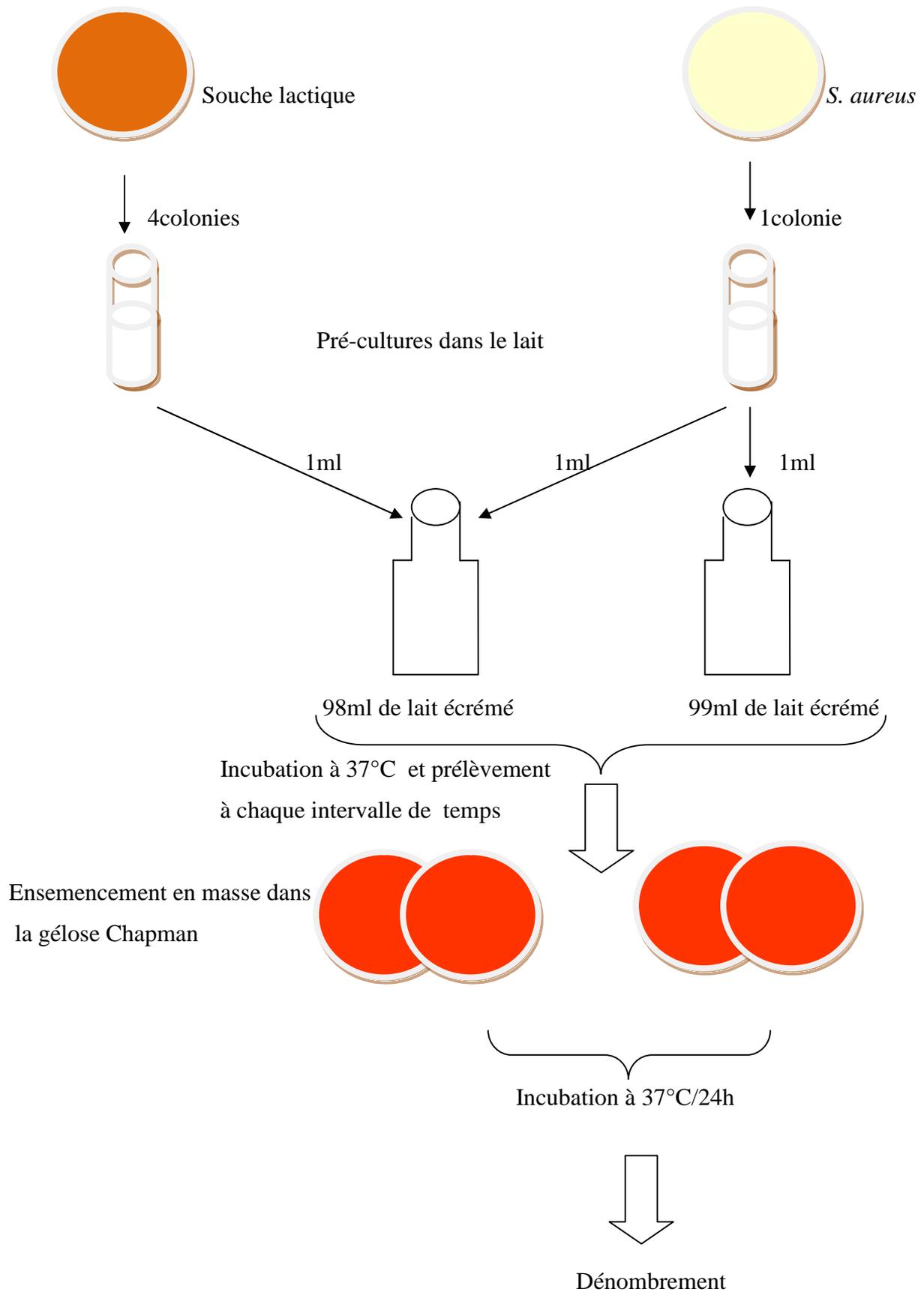


Figure 9: Etapes de réalisation du test d'antagonisme dans le lait.



*Résultats et
discussion*

II.1. Bactéries lactiques

II.1.1. Aspect macroscopique

✓ Sur milieu solide

Les colonies des bactéries lactiques apparaissent sur gélose MRS sous forme de colonies de couleur blanchâtre, forme lenticulaire ou circulaire (Figure 10).



Figure 10 : Aspect des bactéries lactiques sur gélose MRS.

✓ Sur milieu liquide

Dans le bouillon MRS la croissance des bactéries lactiques apparait sous forme de trouble. Ce trouble est concentré au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries (Figure 11).

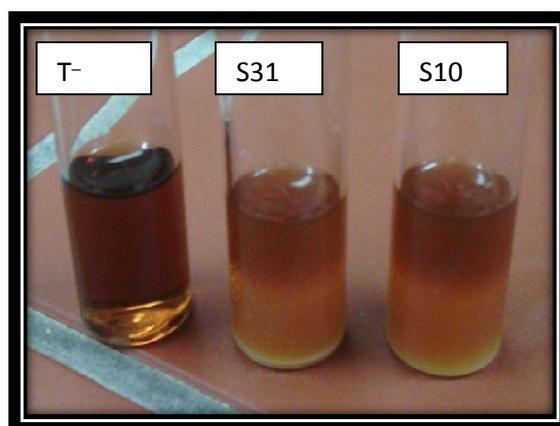


Figure 11 : Aspect des bactéries lactiques dans du bouillon MRS.

II.1.2. Test de la catalase

Selon les caractéristiques des bactéries lactiques, toutes les souches étudiées ne possèdent pas la catalase.

II.1.3. Aspect microscopique

Les bactéries lactiques peuvent être sphériques (Cocci), en forme bâtonnet (bacille) ou intermédiaire (coccobacille) individuelles ou regroupés en diplo, ou en chaînettes. Les colonies obtenues sont observées après une coloration de Gram au microscope optique (x100) (ZEISS West, Germany) (Figure 12).

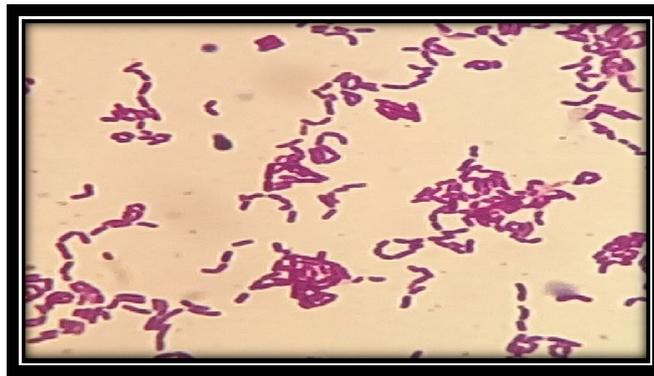


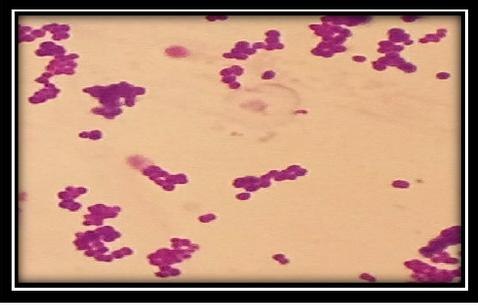
Figure 12 : Aspect microscopique d'une souche de bactérie lactique sous microscope optique.

II.2. Les souches pathogènes

Les aspects macroscopique et microscopique et le résultat de test catalase sont présentés dans le tableau IV.

Résultats et discussion

Tableau IV : Résultats de l'aspect macroscopique et microscopique des souches de *S. aureus*.

Test effectué	Résultats	Illustration
Culture sur gélose Chapman	Colonies jaunes dorés avec un virage du milieu au jaune.	
Culture sur gélose nutritive.	Colonies jaunes claires.	
Aspect microscopique après coloration de Gram.	Coccis disposés en grappe de raisins ou en amas.	
Test de la catalase.	Apparition d'une effervescence.	

II.3. Résultats de la standardisation des inocula

Afin de pouvoir effectuer les tests antibactériens, les inocula des souches de bactéries lactiques ainsi que les souches de *S. aureus* ont été standardisés, les résultats sont présentés dans le tableau V.

Tableau V : Résultats de la standardisation des inocula lactiques et pathogènes dans bouillon MRS et lait écrémé stérile.

Souches	milieux	Nombre de colonies	Nombre de cellules (UFC/ml)
S10	Bouillon MRS	4	$3,1. 10^9$
St5	Bouillon nutritif	1	1.10^9
S10	Lait écrémé	4	$4,2. 10^9$
S7	Lait écrémé	4	$1,6. 10^8$
St5	Lait écrémé	1	1.10^9

II.4. Mise en évidence de l'activité anti *S. aureus*

II.4.1. Test des spots

Les six souches de bactéries lactiques sélectionnés, présentent des activités antibactériennes importantes à l'égard des souches de *S. aureus* St2, St5 et StLb2.

Les résultats de l'inhibition obtenue, révèlent la présence de zones claires autour des spots. Ces résultats sont mentionnés dans la figure 13.

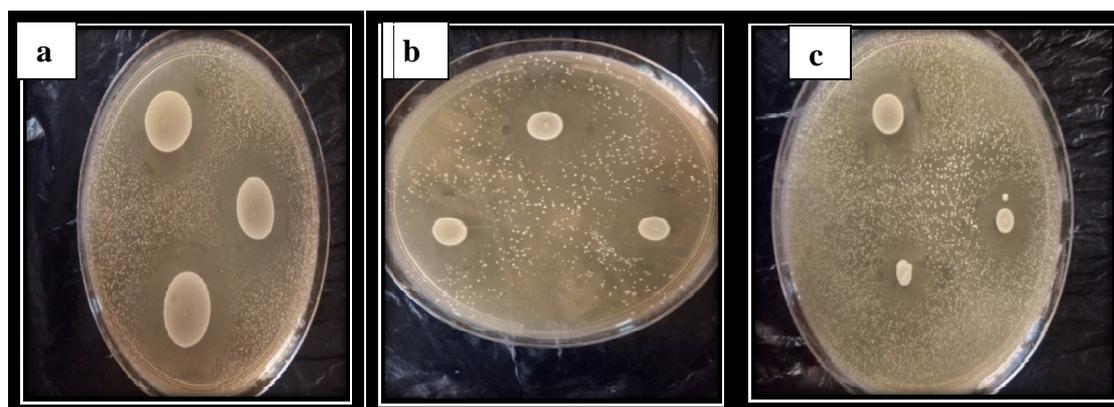


Figure 13 : Résultats obtenus par la méthode des spots vis-à-vis de *S. aureus*.

a/ Zones d'inhibition obtenues à l'égard de St2.

b/ Zones d'inhibition obtenues à l'égard de St5.

c/ Zones d'inhibition obtenues à l'égard de StLb2.

La Figure 14 présente les moyennes des diamètres des zones d'inhibition exprimées en millimètres obtenus pour chaque souche. Cette Figure montre clairement que les six souches de bactéries lactiques utilisées avaient une activité inhibitrice à l'égard des trois souches de *S. aureus*. L'inhibition est notée positive l'orsqu'elle est supérieure à 1mm (Schillinger et Lucke, 1989).

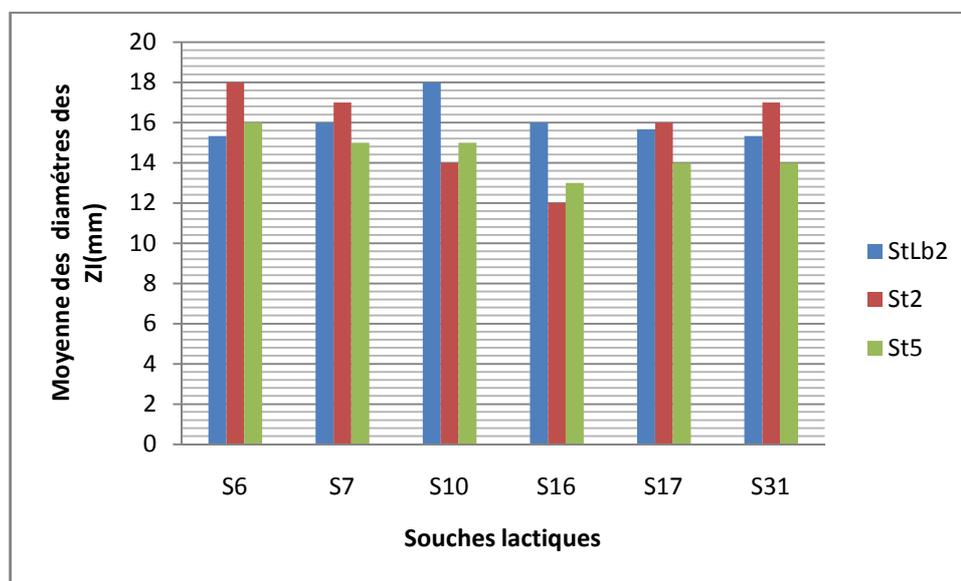


Figure14 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition exprimées en millimètres obtenus pour chaque souche par le test des spots.

Les résultats obtenus au niveau de la figure (13) ont montré la présence de zone d'inhibition autour des spots traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre les souches cibles utilisées.

Les meilleures zones d'inhibition ont été observées pour les souches S6, S7 et S31 à l'égard de St2 (17mm et 18 mm). Cependant, les souches S6, S7 et S10 présentent la meilleure activité contre la souche St5 (15mm et 16mm). La souche StLb2 la plus sensible à l'activité des souches S6, S7 et S10 (17 mm et 18mm). Donc, l'effet inhibiteur pour chaque bactérie lactique a été différent d'une souche cible à l'autre (figure 14).

Des résultats similaires ont été rapportés par **Djdouni (2013)** qui a remarqué que les Lactobacilles possèdent un meilleur effet antagoniste par rapport aux *Pediococcus* et les *Enterococcus*, et également trouvé que la souche *Lb. plantarum* et l'espèce la plus inhibitrice parmi les Lactobacilles. **Mami (2013)** a étudié l'activité antibactérienne d'une souche de *Lb. plantarum* à l'égard de 3 souches de *S. aureus* par le test des spots, il a rapporté que l'activité inhibitrice a été différente d'une souche à une autre.

L'activité inhibitrice des bactéries lactiques peut être attribuée à plusieurs substances telles que les acides organiques (l'acide lactique, acétique,...), le CO₂, la reutéline, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Selon **Mastromarino et al. (2002)**, l'effet inhibiteur pourrait être dû à l'existence d'une compétition nutritionnelle dans le milieu de culture.

Le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques, d'origine laitière, contre des bactéries pathogènes et d'altération a été rapporté par plusieurs auteurs (**Mami et al., 2008 ; Castro et al., 2011 ; Achemchem, 2014 ; Guetouache et Guessas, 2015**).

II.4.2. Test des puits

L'objectif de ce test est de déterminer la nature des substances antibactérienne. Pour ce la, un test de diffusion sur gélose (test des puits), à été réalisé pour éliminer l'hypothèse des compétions nutritives.

Dans ce test, aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des puits (Figure 15), et ceci malgré les nombreuses répétitions effectuées vis-à-vis de trois souches cibles.

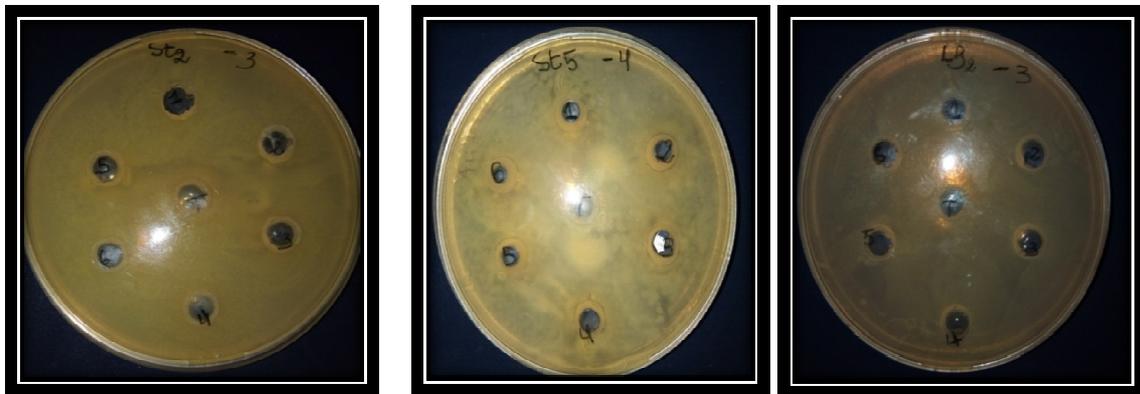


Figure 15: Résultats obtenus par la méthode des puits avec les surnageants natifs vis-à-vis de *S. aureus*.

L'absence des zones d'inhibition autour des puits traduit l'absence de l'activité antibactérienne dans ces surnageants. Des résultats similaires ont été signalés par **Ammor et al. (2006)** où l'activité a été détectée seulement par le test des spots, tandis que la recherche de celle-ci dans le surnageant étant sans succès. Ceci a été expliqué par l'attachement des bactériocines à la paroi de la cellule productrice. L'inhibition n'aura donc lieu que lorsque ces dernières soient en contact avec la souche cible.

L'incapacité des bactéries lactiques à produire les bactériocines dans le milieu de culture liquide a été déjà signalée par **Barefoot et Klaenhammer (1983)** qui ont suggéré que cette production peut être probablement attribuée à l'inactivation des bactériocines par les enzymes protéolytiques sous les conditions de croissance.

Lyon et Glatz (1993) ont trouvé que la production de propionicine était si faible en bouillon et que son activité n'a pu être détectée que dans des échantillons de surnageants concentrés.

II.4.3. Antagonisme en microplaque

L'objectif de ce test est de chercher l'activité antibactérienne dans les surnageants de culture.

Les résultats obtenus ont montré une différence d'absorbance entre les souches. Cette différence dans les absorbances indique une différence dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus* par les souches lactiques. Des diminutions des absorbances à 630nm en présence des surnageants de culture des bactéries lactiques en comparant avec le témoin négatif (*S. aureus* pure), qui révèle l'effet inhibiteur des souches lactiques. Les meilleures inhibitions de croissance sont obtenues avec les souches S6 (vis-à-vis de St2 et StLb2) et S7 (vis-à-vis de StLb2 et St5) (figure16).

La loi de Beer Lambert ($A=\epsilon lC$) n'est valable que pour les faibles concentrations est en générale pour des absorbances inférieure à 1.

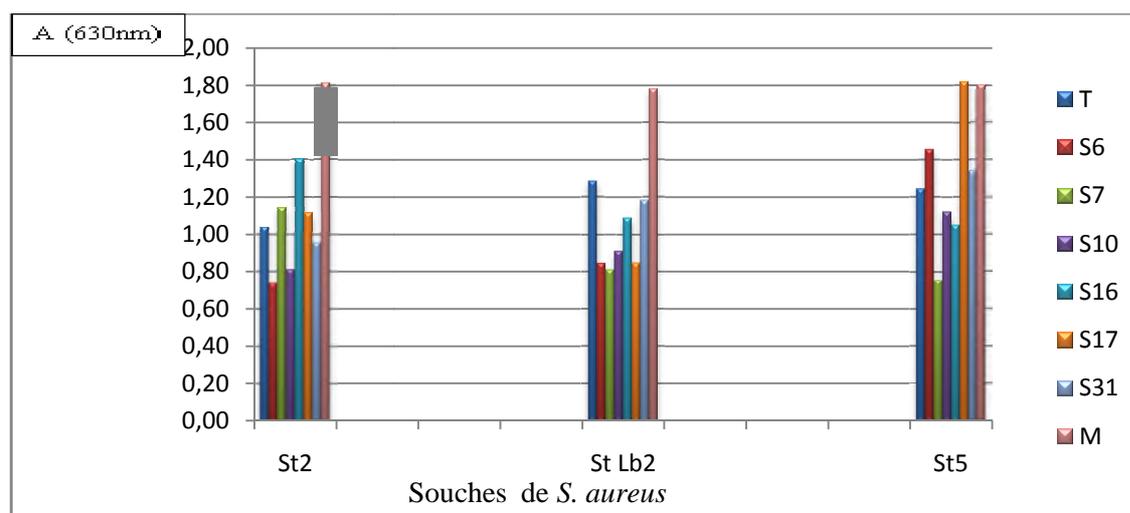


Figure 16 : Résultats de l'effet antibactérien des surnageants des souches lactiques vis-à-vis des souches de *S. aureus*.

II.4.4. Etude de l'antagonisme dans le lait

Cette étude a été réalisée en suivant l'évolution de la croissance de *S. aureus* (St5) en cultures pure et mixte avec la souche lactique (S16). Le taux initial de la souche St5 en culture mixte et pure était de 10^3 UFC/ml. Les dénombrements ont été effectués toutes les deux heures (figure 17).

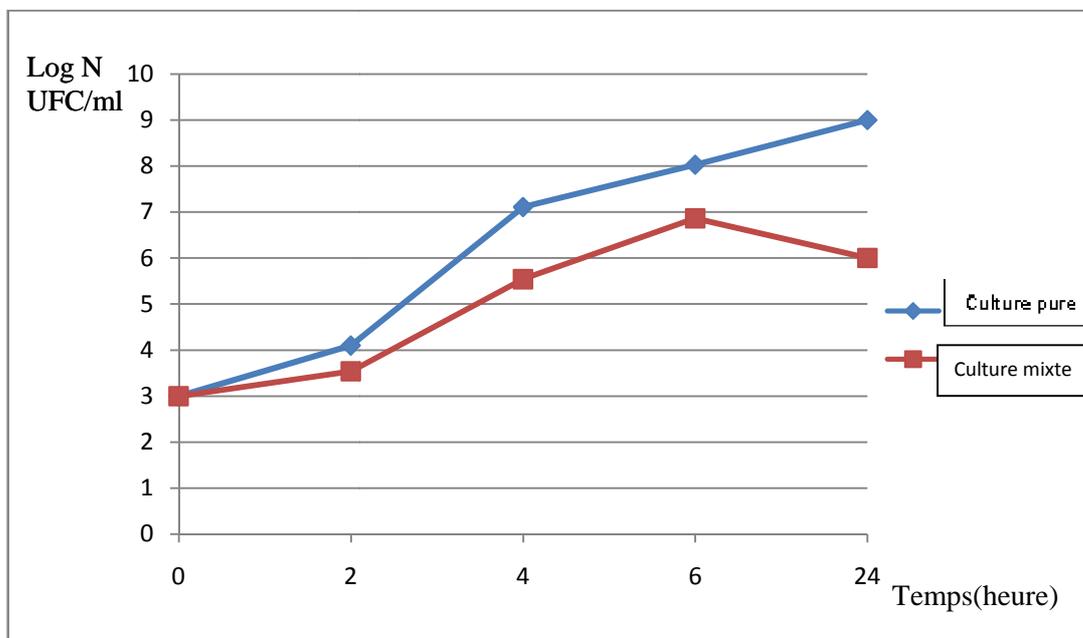


Figure 17 : Résultats de l'étude de l'antagonisme dans le lait.

Les résultats rapportés dans la figure 17 montrent que la souche de *S. aureus* (St5) en culture pure présente une courbe de croissance normale. Elle aborde la phase exponentielle dès le début de la culture. Cependant, en culture mixte on remarque déjà une différence de 1 log entre les deux types de culture après 2h d'incubation. Après 6h d'incubation, le taux de *S. aureus* a augmenté et a atteint $6,86 \cdot 10^6$ UFC/ml. Après 24h d'incubation, le nombre de *S.aureus* en culture mixte a diminué et atteint 10^6 UFC/ml avec une différence de 3 logs en comparaison avec la culture pure où un taux de 10^9 UFC/ml a été enregistré. Cette réduction indique un effet inhibiteur de la souche lactique sur la croissance de St5.

D'après **Haines et Harmon (1973)**, la croissance de *S. aureus* dans le lait peut être inhibé par H_2O_2 produit par la souche lactique, ou à un autre facteur antistaphylococcique tel que la compétition pour la biotine et la niacine.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Mami (2013)** qui a étudié la cinétique de la croissance de *S. aureus* en cultures pure et mixte dans le lait écrémé où la

souche lactique présente une forte activité inhibitrice. Les même résultats ont été rapportés par **Keramane (2009)** et par **Madi (2010)** dans leurs travaux avec *Lc. lactis* et *Lb. paracasei* respectivement.

Otero et al. (2006) ont observé une inhibition de la croissance de *S. aureus* par *Lb. gasseri* en présence et en absence d'oxygène. Toutefois, ils ont constaté qu'après 24h d'incubation en anaérobiose, la réduction de la croissance de *S. aureus* est de 2 logs par rapport à l'inoculum de départ. Par contre en aérobiose, une inhibition totale de la croissance de *S. aureus* est observée après 24h de culture. L'activité antibactérienne de *Lb. gasseri* à l'égard de *S. aureus* est attribuée au peroxyde d'hydrogène.



Conclusion

Conclusion

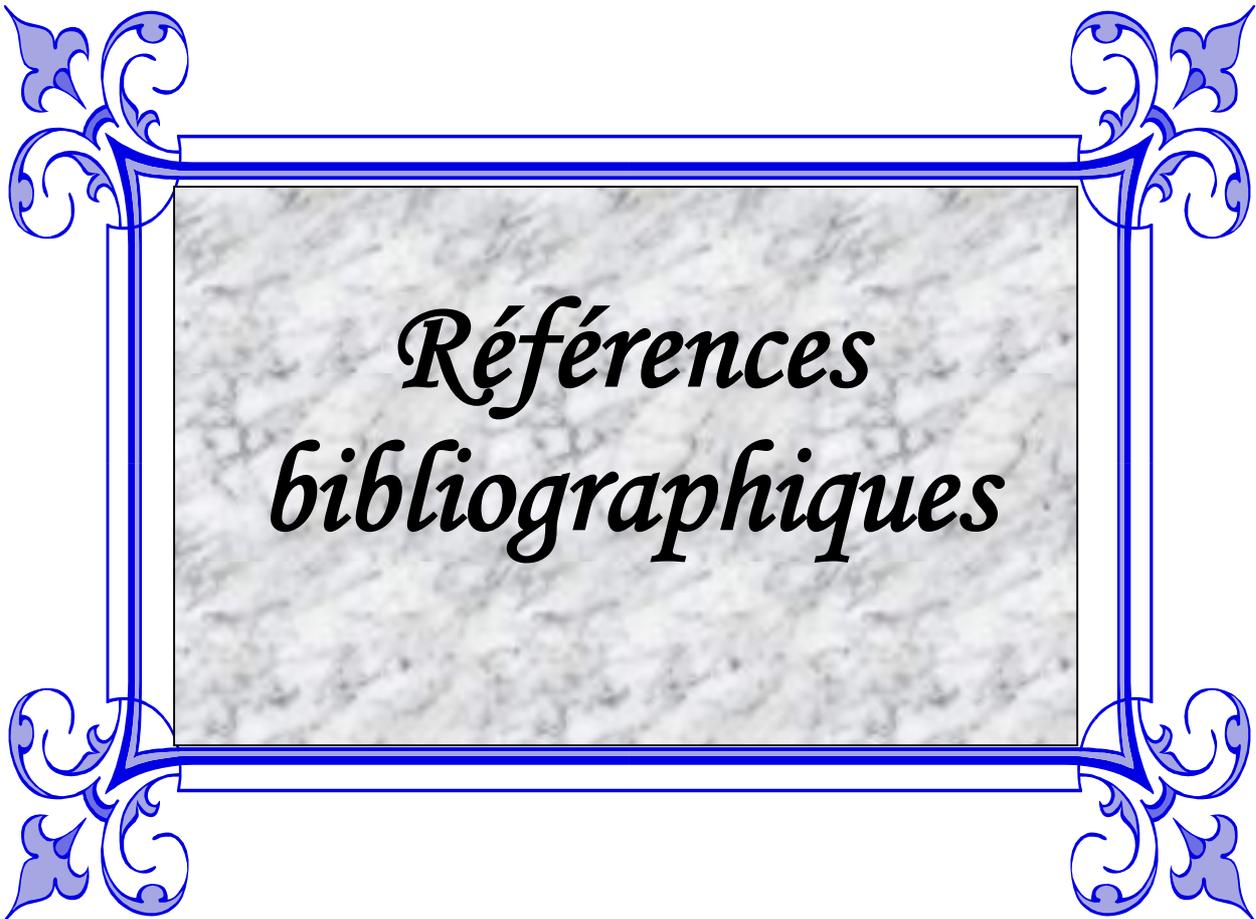
Notre travail à porté sur l'étude de l'activité antibactérienne de six souches de bactéries lactiques isolées de quelques produits laitiers artisanaux à l'égard de trois souches de *S. aureus* (St2, St5 et StLb2). Les résultats obtenus avec le test des spots ont montré que les six souches de bactéries lactiques avaient une bonne activité antistaphylococcique avec des diamètres variant entre 12mm et 23mm. Ce test a montré que la souche S6 est la plus active et la souche St2 est la moins sensible à l'activité des souches de bactéries lactiques.

Les résultats du test des puits n'ont montré aucune inhibition d'où l'absence de l'activité antibactérienne dans les surnageants de culture. Les résultats du suivit de la cinétique de la croissance de *S. aureus* en culture pure et mixte dans le lait écrémé a montré que la croissance en culture mixte commence a être inhibée à partir de 2h d'incubation. Cette inhibition continue jusqu'à 24h d'incubation où une différence de 3 logs à été observée en comparaisant avec la culture pure de *S. aureus* qui atteint 10^9 UFC/ml.

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer que les souches de bactéries lactiques étudiées ont la capacité d'inhiber les souches de *S. aureus* une fois se trouvent ensemble dans le lait. Cette inhibition peut être un moyen d'éviter les toxi-infections alimentaires à *S. aureus* dues à la consommation de lait et de produits laitiers contaminés par cette bactérie pathogène.

Nous espérons donner suite à ce travail afin de compléter :

- La recherche de l'effet antibactérien dans les surnageants de culture en faisant une concentration de ces derniers.
- La mise en évidence de la nature de ces substances antimicrobiennes, leur extraction et purification afin de les intégrer dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique.
- La détermination de l'effet antibactérien à l'égard d'autres espèces bactériennes pathogènes où d'altération pouvant exister ou contaminer le lait.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Ababsa A. (2012). Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de Magister de Génie Microbiologique .Université de Setif. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Setif, 63p.

Achemchem F. (2014). Bactériocines des bactéries lactiques de lait et de fromage de chevre. Purification, caractérisation et application dans le contrôle de *Listeria monocytogenes* serovar 4b. Presses Académiques Francophones. Deutschland. 350p.

Ammor S, Tauveron G, Dufour E et Chevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. 17, 454–461.

Axelsson L T, Chung T C, Dobrogosz W J and Lindgren, S E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2, 131–136.

B

Balciunas E M, Castillo Martinez F A, Todorov S D, Franco B D G de M, Converti, A et Oliveira R P de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32 (1), 134–142.

Barefoot S F et Klaenhammer T R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45 (6), 1808–1815.

Beales N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3, 1–20.

Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, De Buyser M L , Collette C, Garin-Bastuji B et Thorel M F. (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Revue Scientifique et Technique*. 16 (1), 452–471.

C

Castro M P, Palavecino NZ, Herman C, Garro O A, Campos C A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*. 87, 321–329.

Références bibliographiques

Charlier C, Even S, Gautier M et Le Loir Y.(2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* y. 131, 30–39.

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

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

Curk M C, Peladan F and Hubert J C. (1993). Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Lait*. 73, 215–231.

D

Djadouni F. (2013). Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats de bactéries lactiques et détermination du spectre d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. Thèse de Doctorat de Microbiologiques Appliquée .Université d'Oran, Faculté des Sciences, Oran, 155p.

De Buyser M L et Sutrat L. (2005). *Stapylococcus aureus*. In : Federighi M. Bactériologie Alimentaire. Economica. Paris. pp 25-51.

Dellaglio F,de Roissart H, Tourriani S, Curk M C et Jenssen D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In De de Roissert,H., et Luquet,F.M. «bactéries lactiques». Volume 1.Lorica: uriage. pp 25-116.

Dridier D, Fimland G, Hechard, Y, McMullen L M et Prevost H. (2006). The continuing story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology*. 70 (2), 564-582.

Dortu C et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 13 (1), 143-154.

Drouault S et Corthier G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*. 32, 101–117.

Références bibliographiques

E

Ennahar S, Aoude-Werner D, Assobhei O, Hasselman C (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 85, 521-526.

G

Gautam N et Sharma N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology* 49, 204–211.

Guiraud J P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Edition: Dunod. Paris. 615 p.

Guetouache M et Guessas, B. (2015). Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (*Klila*) prepared from cow's milk. *African Journal of Microbiology Research*. 9 (2), 71-77.

H

Haines W C , Harmon L. G. (1973). Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of Enterotoxin. *Applied Microbiology*. 25 (3), 436-441.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson G R, Merenstein D J, Pot B, Morelli L, Berni Canani R, Flint H J, Salminen S, Calder P C et Sanders ME. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotic consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology et Hepatology*. 11, 506-516.

Holzappel W H, Habere P, Geisen R, Bjorkroth J, Schilinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 36S-73S.

Hennekinne J A, De Buyser M L et Dragacci S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 36, 815–836.

Hernandez D, Cardell E et Zárata V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 77–84.

Références bibliographiques

J

Jay J M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied Environmental Microbiology*. 44 (3), 525-532.

K

Keramane B. (2009). Effet antibactériens des Lactocoques à l'égard de *Staphylococcus aureus* multi-résistant. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université A/MIRA de Béjaia. Faculté des sciences de la Nature et de la vie. 90p.

Kong C, Neoh H et Nathan S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins*. 8 (72) 1-21.

Konig H et Frohlich J. (2009). Lactic acid bacteria. In: Konig H, Uden G, Frohlich. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 1-29.

Kulshrestha D C et Marth E H. (1974). Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk : IV. *Streptococcus lactis* 1. *Journal of Milk and Food Technology* 37 (12), 593–599.

L

Le Loir et Gantier. (2009). *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. Paris. 277p.

Li S J, Hu D L, Maina EK, Shinagawa K, Omoe K et Nakane A. (2011). Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes: Stability of TSST-1 to heat and enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. 110, 729–736.

Ludwig W, Schleifer K-H, Whiman W B. (2009). Ordre: Lactobacillales. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Three: Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 464p.

Lyon W J et Glatz B A. (1993). Isolation and purification of propionin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *propionibacterium thoenii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (1), 83-88.

Références bibliographiques

M

Madi N. (2010). Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne envers *Stapylococcus aureus* multirésistant. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université A/MIRA de Béjaia. Faculté des sciences de la Nature et de la vie. 89p.

Mami A, Henni J E et Kihal M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from alegerian raw goat's milk against *Stapylococcus aureus*. World Journal of Dairy et Food Sciences. 3 (2): 39-49.

Mami A (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis -à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de Doctorat de Microbiologique Appliquée. Université d'Oran, Faculté des Sciences, Oran, 164p.

Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, Conte U et Matteuzzi D. (2002). Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. Journal of Applied Microbiology 93, 884–893.

O

Osborne J P, Mira de Orduna R , Pilone G J and Liu S Q. (2000). Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 191, 51–55.

Otero M C, Nader-Macias M E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Animal Reproduction Science. 96, 35–46.

P

Patel H, Vaghasiya Y, Vyas B R M et Chanda S. (2012). Antibiotic-resistant *Stapylococcus aureus* : A challenge to researchers and clinicians. Bacteriology Journal. 2 (2), 23-45.

Patterson C A. (2008). Probiotiques : Bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. Agriculture et Agroalimentaire .Canada. pp 1-4.

Piard J C et Desmazeaud M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait. 71, 525–541.

Piard J C et Desmazeaud M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.

Références bibliographiques

2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*. 72, 113–142.

Pilet M F, Mográs C et Federighi M. (2005). Bactéries lactiques. In : Federighi M. Bactériologie Alimentaire. Economica. Paris. pp 219-242.

Privat K et thonart P. (2011). Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 15 (2), 339-348.

R

Rodriguez E, Arques J L, Rodriguez R, Nunez M et Medina M. (2003). Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Letters in Applied Microbiology* 37, 259–263.

S

Samot J et Badet C (2013). Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe* 19, 34–38.

Schillinger U et Lücke F K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55 (8), 1901–1906.

Schnürer J et Magnusson J .(2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*. 16, 70–78.

Schleifer K-H. (2009). Family I. Lactobacillaceae. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg N R, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whimam W B. (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Three: Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 465p.

Simova. E D , Beshkova D B et Dimitrov Z P. (2009). Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 106, 692–701.

Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. 207p.

Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Lebos Pavunc A, Habjanic K et Matosic S. (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48 (3) 296–307.

Références bibliographiques

T

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

V

Vollenweider S et Lacroix C. (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 64, 16–27.

Y

Yang Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria their structures and properties. Thesis, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food Technology University, University of Helsinki. 61p.

Z

Zagorec M et Christians S. (2013). Flore protectrice pour la conservation des aliments. QUAI. Paris.145p.



Annexes

Annexes

Annexe I. Données bibliographiques

Tableau I : Classification des bactériocines (Balciunas et al., 2013).

Classification	Caractéristiques	Sous-catégories	Exemple
Classe I ou lantibiotiques	Lanthionine ou des peptides contenant de la β -lanthionine	Type A (molécules linéaires)	Nisine, subtiline, épidermine
		Type B (molécule globulaire)	Mersacidine
Classe II	Classe hétérogène de petits peptides thermostables	IIa (type Bactériocines antilisterial-pediocine)	Pediocine, enterocine, sakacine
		IIb (composée de deux peptides)	Plantaricine, lactacine F
		IIc autres bactériocines	Lactococcine
Classe III	Grands peptides thermolabiles		Helveticine J, milléricine B

Tableau II : Conditions requises pour la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines (Hennekinne et al., 2012).

Facteur	Croissance de <i>S. aureus</i>		Production d'entérotoxines par <i>S. aureus</i>	
	Optimale	Possible	Optimale	Possible
Température (°C)	37	7 à 48	37 à 45	10 à 45
pH	6 à 7	4 à 10	7 à 8	4 à 9,6
<i>a</i>W	0,98	0,83 à 0,99	0,98	0,85 à 0,99
[NaCl] (%)	0	0 à 20	0	0 à 10
Potentiel redox	> +200 mV	< -200mV	> +200 mV	< -100 mV à > +200mV
	à >+200 mV			
Atmosphère	Aérobie	Anaérobie / Aérobie	Aérobie (5 à 20% de O ₂)	Anaérobie / Aérobie

Annexes

Annexe II. Résultats

Tableau I : Résultats du Test des spots à l'égard de StLb2, St2, St5.

Souches pathogènes / Souches lactiques	<i>S. aureus</i> (St LB2)				<i>S. aureus</i> (St2)				<i>S. aureus</i> (St5)			
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne
S6	12	11	23	12	18	16	19	17,66	14	11	23	16
S7	17	12	19	12,66	13	17	20	16,66	11	14	21	15,33
S10	18	10	26	14	15	13	15	14,33	14	15	15	14,66
S16	17	16	15	16	14	10	13	12,33	11	10	18	13
S17	20	10	17	15,66	16	14	17	15,66	12	10	21	14,66
S31	19	12	15	15,33	15	17	20	17,33	10	12	20	17

Tableau II : Résultats de l'étude de l'antagonisme dans le lait (log N (UFC/ ml)).

Temps	0h	2h	4h	6h	24h
Culture pure	3	4,1	7,11	8,03	9
Culture mixte	3	3,54	5,54	6,86	6

Tableau III : Résultats de l'antagonisme en microplaque à l'égard de St2, StLb2, St5.

Souches pathogènes / Souches lactiques	<i>S. aureus</i> (St2)	<i>S. aureus</i> (St LB2)	<i>S. aureus</i> (St5)
T	1,04	1,29	1,24
6	0,74	0,85	1,46
7	1,14	0,81	0,76
10	0,81	0,91	1,12
16	1,40	1,09	1,05
17	1,11	0,85	1,82
31	0,96	1,18	1,34
Blanc	1,81	1,78	1,80

Annexes

Annexe III. Composition des milieux de culture utilisés

Tableau I: Gélose Mueller Hinton.

Composition	Quantité (g/l)
Infusion de bœuf	2
Acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	17
pH	7,4

Tableau II : Bouillon et gélose MRS.

Composition	Quantité (g/l)
Peptospecial	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Triammonium citrate	2
Acetate de sodium	5
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Dipotassium phosphate	2
Agar	13
pH	6,2

Tableau III : Bouillon et gélose nutritive.

Composition	Quantité (g/l)
Peptone de bœuf	5
Extrait de viande	3
Agar	15
pH	6,8

Tableau IV : Gélose Chapman

Composition	Quantité (g/l)
Trypton	5
Peptone pepsique de viande	5
Extrait de viande	1
Mannitol	10
Chlorure de sodium	75
Rouge de phénol	0,025
Agar	15
pH	7,4

Annexes

Tableau V : Bouillon BHI

Composition	Quantité (g/l)
Infusion cœur- cervelle-peptone	27,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2,5
D (+) glucose	2
pH	7,4

Résumé

Dans cette étude, l'activité antibactérienne de six souches de bactéries lactiques a été testée sur trois souches de *S. aureus*. L'interaction des souches lactiques avec les souches pathogènes était détectée par les tests d'antagonisme : spots, puits et co-culture dans le lait et en microplaques. D'après les résultats du test des spots, les souches lactiques étudiées avaient une bonne activité antibactérienne avec des diamètres allant de 12 à 23 mm. Alors que le test des puits n'a montré aucun effet antistaphylococcique. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un autre test, celui de l'antagonisme en microplaque, qui a montré l'effet inhibiteur des surnageants de certaines souches de bactéries lactiques vis-à-vis des souches de *S. aureus*. Le test d'antagonisme dans le lait a prouvé la capacité de la souche S16 à réduire le taux de croissance de St5 en culture mixte avec une différence de 3 logs en comparaison avec la culture pure.

Mots clés : Bactéries lactiques, activité antibactérienne, *S. aureus*, antagonisme, culture mixte.

Abstract

In this study, the antibacterial activity of six strains of lactic bacteria at summer tested on three strains of *S. aureus*. The interaction of our lactic strains with the pathogenic strains was detected by the tests of antagonism: spots, well and antagonism in milk and into microplate. According to the results of the test of the spots, the studied lactic strains had a good antibacterial activity with diameters going from 12 to 23 mm. the test of the wells did not show any effect antistaphylococcic. The results obtained were the subject of another test, that of the antagonism in to microplate, which showed the inhibiting effect of the supernatants of some strains of lactic bacteria against to the strain of *S. aureus*. The test of antagonism in milk was proved the capacity of the strain S16 to reduce the growth rate of St5 in mixed culture with a difference of 3 logs in comparison with the pure culture.

Key words: Lactic acid bacteria, antibacterial, activity, *S. aureus*, antagonism, mixed culture.