

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Réf :.....

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

Thème

**Etude de l'activité antimicrobienne de quelques
bactéries lactiques du genre *Lactobacillus***

Présenté par :

ZINET Houria

Soutenu le : **26 juin 2023**

Devant le jury composé de :

Mme. TETILI. F

MCB

Président

Mme. BENACHOUR. K.

MAA

Encadreur

Mr. BENDJEDDOU. K

MCA

Examinatrice

Année universitaire :2022 /2023

Remerciements

Au début et avant tout, le remerciement et louange à Dieu le tout puissant, de M'avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail.

Je dois l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je remercie mon encadreur Mme **BENACHOUR Karima**, qu'avant qu'elle soit notre encadreur était notre enseignante. Vous êtes le professeur qui a réussi à m'inspirer et me donner confiance en soi et en l'avenir mais aussi qui a réussi à me donner l'envie d'apprendre. Merci pour tout ce que vous avez fait, ainsi là aujourd'hui Vous m'avez inspiré ce thème et vous avez guidé mes premiers pas dans la recherche. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre efficacité et surtout votre rigueur scientifique qui m'a apporté une compréhension approfondie sur le plan scientifique. Merci pour votre aide et votre regard critique qui ont été grandement utiles au cours de mon travail et lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **TETILIF** qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie également Monsieur **BENDJEDDOU K.**, d'avoir accepté d'examiner cette étude.

Mes vifs remerciements s'adressent également à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail et qui ont encouragé et soutenu à tout moment.

Dédicace

***Avant tous, Mes profonds remerciements s'adressent à ALLAH qui m'a aidé
et donné le courage et la patience pour effectuer ce travail.***

Je dédie ce modeste travail à :

***Mes très chers parents qui ont été toujours à mes côtés, pour leur générosité
leurs sacrifices et le courage qu'ils m'ont donné pour terminer mes études.***

Grand merci Je vous aime beaucoup.

A toutes mes sœurs.

A tous mes collègues d'études

A tous ceux que je porte dans mon cœur.

Liste des abréviations

Ac : Acide

DO : densité optique

E : *Escherichia*

Sp : espèce

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

MRS : Man Rogosa et Sharpe

S : *Staphylococcus*

G+C% : pourcentage de la guanine et de la cytosine

Lb : *Lactobacillus*

MH : Müller Hinton

LAB : Lactic Acid Bacteria

G : rotation par minute

NaCl : chlorure de sodium

UFC : unité formant colonie

pH : potentiel d'hydrogène

Liste des figures

Figure 01 : Image au microscope électronique à balayage de la souche <i>Lb.rhamnosus GG</i> (Zohri et Khoubzi, 2019)	05
Figure 02 : Schéma représentatif du test de spot.....	13
Figure 03 : Schéma représentatif du test de puits.....	14
Figure 04 : aspect des <i>Lactobacillus</i> sur gélose MRS.....	16
Figure 05: Diamètres des zones d'inhibitions (en millimètres) résultants du test des spots de <i>Lactobacillus</i> à l'égard des souches de bactéries pathogènes.....	17
Figure 06: Diamètres des zones d'inhibitions (en millimètres) résultants du test des puits des surnageant natifs à l'égard des souches de bactéries pathogènes.....	19
Figure 07: Diamètres des zones d'inhibitions (en millimètres) résultants du test des puits de surnageant neutralisés à l'égard des souches de bactéries pathogènes.....	20

Liste des tableaux

Tableau 01 : Souches de Lactobacilles utilisées et leurs codes.....11

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Partie 01 : Synthèse bibliographique

I. Bactéries lactiques03

I.1. Généralités03

I.2. Agents inhibiteurs produits par les bactéries lactiques04

II. Genre *Lactobacillus*05

II.1. Caractères morphologiques05

II.2. Caractères biochimiques05

II.3. Caractères cultureux06

II.4. Habitat06

III. *Staphylococcus aureus*07

III.1. Généralités07

III.2. Caractères morphologiques et bactériologique07

III.3. Caractères physiologiques et biochimiques08

III.4. Caractères cultureux08

III.5. *Staphylococcus aureus* et les antibiotiques08

IV. Genre *Bacillus*09

IV.1. Caractères généraux et classification09

V. *Escherichia coli*09

V.1. Généralités et classification.....	09
V.2. Les caractéristiques bactériologiques de l'espèce.....	10

Partie 02 : Partie pratique

I. Matériel et méthodes	11
I.1. Matériel biologique	11
I.1.1. Bactéries lactiques	11
I.1.2. Bactéries pathogènes	11
I.2. Revivification et la purification des souches utilisées	11
I.3. Recherche de l'activité antimicrobienne	12
I.3.1. Tests d'activité antimicrobienne	12
I.3.2. Test des spots (Antagonisme direct).....	12
I.3.3. Test des puits	13
II. Résultat et discussion	14
II.1. Revivification des souches	14
II.1.1. Revivification des souches lactiques	14
II.1.2. Revivification des souches pathogènes.....	14
II.2. Vérification de la pureté des souches	14
II.2.1. Aspect macroscopique.....	14
II.2.2. Aspect microscopique.....	15
II.3. Tests d'activité antimicrobienne.....	15
II.3.1. Test des spots	15
I.3.2. Antagonisme indirect	17
➤ Test des puits	17

➤ Cas de surnageant natif	17
➤ Cas de surnageant neutralisé	17
Conclusion	19
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H₂O₂) et des substances naturelles de nature protéique, douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de bactéries d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (**Allouche et al., 2010**).

L'importance des bactéries lactiques dans la technologie de l'alimentation Humaine et animale est lié à leur production de grandes quantités d'acide lactique à partir de sucre, et ce dernier réduira le potentiel de croissance de nombreux micro-organismes et agira donc comme un conservateur naturel qui empêche la détérioration des aliments (**Luquet, 2008**).

Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (**Allouche et al., 2010**).

De nombreuses possibilités d'utilisation ont été envisagées, pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique et de la médecine. Ces nouvelles substances naturelles produites par des souches bactériennes universellement reconnues d'usage alimentaire dirigées contre des germes pathogènes pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours du processus de fabrication (**Allouche et al., 2010**).

En effet, l'utilisation d'antibiotiques comme le traitement standard devient problématique (**Oana et al., 2010; Azam-tanji, 2019**), par conséquent les scientifiques intensifient leurs recherches afin de trouver des biomolécules qui méritent d'être envisagées comme alternatives aux antibiotiques et aux conservateurs chimiques.

Dans ce contexte, ce travail consiste à mettre en évidence l'effet des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* vis-à-vis des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM), *E. coli* et *Bacillus cereus*.

Cette étude est scindée en deux parties, une première qui est une synthèse bibliographique sur les *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Bacillus cereus*. La deuxième partie

développe la méthodologie du travail, dans laquelle sont représentées les différentes méthodes appliquées et les résultats obtenus.

I. Bactéries lactiques

I.1.Généralités

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ancestraux dont les premiers ancêtres ont probablement émergé il y a environ trois milliards d'années, antérieurement aux Cyanobactéries. Depuis plus de 4000 ans, elles ont été utilisées pour la fermentation des aliments, sans que la base scientifique de leur utilisation soit pleinement comprise. Cependant, leur utilisation a toujours été axée sur la production d'aliments présentant une meilleure conservation et une qualité améliorée (**Boudersa et al., 2017**).

Les bactéries lactiques sont un groupe diversifié de microorganismes qui produisent principalement de l'acide lactique comme produit métabolique. Elles sont présentes dans de nombreux aliments tels que les produits laitiers, la viande, les légumes et les céréales, et font également partie de la flore intestinale et vaginale chez les Humains et les animaux. Elles jouent un rôle important dans de nombreuses fermentations spontanées des aliments, ce qui a conduit à leur reconnaissance en tant que statut GRAS (Generally Recognizer As Safe) en raison de leur utilisation historique et de leur sécurité alimentaire (**Dortu et Thonart, 2009**).

Elles sont fréquemment isolées à partir d'aliments et utilisées comme cultures starters pour la fermentation de la viande, des légumes, des fruits, des boissons et des produits laitiers. De plus, certaines espèces se trouvent également dans le système respiratoire, les voies intestinales et génitales des humains et des animaux, les eaux usées et les matières végétales (**Luquet, 2008**).

Les bactéries lactiques ont une répartition ubiquitaire et sont présentes dans diverses niches écologiques (**Mechai ,2009**). Elles se trouvent à l'état libre dans l'environnement, mais également en association avec des hôtes tels que les humains ou les animaux, dans des écosystèmes bactériens tels que le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères. Par exemple, dans l'environnement, on retrouve fréquemment les bactéries lactiques dans le lait et ses dérivés tels que les laits fermentés et les fromages (**Makhloufi ,2011**).

Les bactéries lactiques sont représentées par de nombreux genres tels que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*(**Luquet, 2008**).

Les bactéries lactiques sont des bactéries possédant une réponse positive à la coloration de Gram, immobiles, non sporulées, catalase-, oxydase et nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolérantes (**Laurent et al., 1998**), se présentant sous formes déférentes, cocci ou bâtonnets (**Bourgeois et Larpent, 1996**). Elles ont des besoins complexes en facteur de croissance : vitamine B, acide aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement fermentaire les conduisant à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques). Elles ont une faible capacité de biosynthèse (**Luquet, 1986**).

I.2. Agents inhibiteurs produits par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été reconnues pour leur potentiel probiotique et leur capacité à inhiber les microorganismes pathogènes, ce qui a ouvert de nouvelles perspectives dans les domaines de la médecine et de la biotechnologie alimentaire (**Menard et Bretelle, 2012 ; Guessas et al., 2004**).

Depuis longtemps, on reconnaît aux bactéries lactiques la capacité de produire des substances antagonistes telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des protéines antimicrobiennes. Les acides lactiques et acétiques excrétés par ces bactéries sont les principaux produits finaux du métabolisme fermentaire et les principaux accepteurs d'électrons. Ces acides organiques jouent un rôle essentiel dans les fonctions antimicrobiennes. Sous leur forme non dissociée, ils peuvent traverser passivement la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire, provoquant une acidification du milieu intracellulaire qui inhibe les fonctions cellulaires et annule le potentiel membranaire (**Kashet, 1987**). Ainsi, l'accumulation d'acides organiques a un effet inhibiteur direct sur les microorganismes nuisibles qui présentent une faible résistance aux variations du pH intracellulaire. De plus, en conditions acides, les bactéries lactiques ont une compétitivité améliorée en raison de leur plus grande tolérance aux pH bas, à la fois à l'extérieur et à l'intérieur des cellules (**Luquet et Roissart, 1994**).

Il a été rapporté que les bactéries lactiques jouent un rôle d'agents bioprotecteurs et sont considérées comme des agents de contrôle biologique (**Milani et al., 1998**). Elles ont démontré leur efficacité dans l'inhibition des agents phytopathogènes (**Bennik et al., 1999**). L'efficacité de leur action antimicrobienne dépend de plusieurs facteurs, notamment :

- ✓ Les caractéristiques du microorganisme lui-même.

- ✓ La nature de l'agent antimicrobien utilisé.
- ✓ Les conditions environnementales dans lesquelles l'action se déroule.

II. Genre *Lactobacillus*

En termes d'importance quantitative, le genre *Lactobacillus* est à la fois le plus grand et le plus important des bactéries lactiques (Huang et al., 2018 ;Belkheziz, 2020). Il a été identifié pour la première fois et fait partie du phylum des Firmicutes, de la classe des Bacilli, de l'ordre des Lactobacillales et de la famille des Lactobacillaceae. Il existe 196 espèces (Huang et al., 2018). La concentration en guanine/cytosine (G/C), qui varie entre 30 et 55 % selon les espèces, est à l'origine de cette variété (Belkhezi, 2020).

II.1. Caractères morphologiques

Les bactéries du genre *Lactobacillus* sont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Elles sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles (Zohri et Khoubzi, 2019).



Figure1. Image au microscope électronique à balayage de la souche *Lb.rhamnosus GG* (Zohri et Khoubzi, 2019) .

II.2. Caractères biochimiques

Les Lactobacilles ne possèdent pas l'enzyme catalase et ne réduisent pas les nitrates. De plus, ils se développent dans des conditions microaérophiles ou anaérobies. Leur métabolisme est de type fermentaire et ils produisent de l'acide lactique. Certaines espèces sont homo-lactiques, tandis que d'autres sont hétéro-lactiques, produisant non seulement de

l'acide lactique, mais aussi des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂ en complément (Zohri et Khouzbi, 2019).

Ils sont classés en trois groupes en fonction de leur type fermentaire, selon la classification d'Orla-Jensen modifiée par Kandler et Weiss (1986).

- **Groupe I "Thermobacterium"**, comprend les Lactobacilles strictement homofermentaires, dont la plupart sont thermophiles et se développent à une température de 45°C, mais pas à 15°C. Les espèces les plus courantes dans l'alimentation, telles que le lait, le yaourt et le fromage, sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* et *Lb. acidophilus*.
- **Groupe II "Streptobacterium"**, regroupe les Lactobacilles homofermentaires mésophiles, qui peuvent occasionnellement être hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus courantes dans l'alimentation sont *Lb. Casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.
- **Groupe III "Betabacterium"**, comprend les Lactobacilles hétérofermentaires. Il comprend les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfrancisco* (Tahlaiti, 2019).

II.3. Caractères cultureux

La culture est favorisée par l'adjonction de 5 à 10% de CO₂, certaines espèces exigent l'anaérobiose (20% des souches rencontrées chez l'Homme). Les *Lactobacillus* ont des exigences nutritives particulières, ils ne se cultivent pas en milieu ordinaire. Ils se développent en milieu acide, notamment dans le milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe; 1960). La plupart des espèces de Lactobacilles ont une température optimale de croissance de 37°C. Leur métabolisme fermentaire les rend bien adaptés à une forte acidification lors de la culture. Le pH optimal de croissance est de 5,5. Leurs besoins nutritionnels sont complexes (Denis et al., 2007).

II.4. Habitat

Les lactobacilles se trouvent naturellement dans de nombreuses muqueuses chez les Humains et les animaux, telles que la cavité buccale, l'intestin, le vagin et l'urètre. Bien qu'ils soient souvent présents dans les produits alimentaires, ils peuvent contribuer à la détérioration des aliments, par exemple en provoquant le verdissement de la viande par transformation de l'hémoglobine. Certaines espèces de lactobacilles sont utilisées dans la production de produits alimentaires tels que les yaourts, les fromages et le vin. Ces bactéries sont généralement peu virulentes, mais dans des cas très rares, elles peuvent causer des infections chez les personnes

immunodéprimées, telles que des septicémies et des endocardites, bien que les infections localisées soient encore plus rares. Les espèces les plus couramment impliquées dans ces infections sont le *Lactobacillus rhamnosus* et le *Lactobacillus casei* (Catherine, 2015).

III. *Staphylococcus aureus*

III.1. Généralités

Les staphylocoques se trouvent naturellement chez l'Homme et les animaux à sang chaud. Leur principale zone de résidence écologique est la partie antérieure du nez. Le *Staphylococcus aureus*, en particulier, possède une grande capacité d'adaptation et de résistance au stress, ce qui lui permet de survivre dans divers environnements. On peut retrouver cette bactérie de manière sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable des plages, l'eau de mer et la surface des plantes. Plus concrètement, elle est largement présente dans les poussières présentes dans l'air et sur les surfaces (Aouati, 2009).

Selon la 9^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les staphylocoques sont classés comme suivant (Prescott, 2010) :

Règne : Bacteria.

Division : Firmicutes.

Classe : Bacilli.

Ordre : Bacillales.

Famille : *Staphylococcaceae* .

Genre : *Staphylococcus*

III.2. Caractères morphologiques et bactériologique

Les Staphylocoques se présentent sous forme de coques en petits amas, en diplocoques ou en chaînettes très courtes composées de trois à cinq éléments. Elles sont colorées positivement au test de Gram. Les Staphylocoques sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives et elles se cultivent facilement sur des milieux courants tels que la gélose nutritive et le bouillon nutritif. Elles peuvent également être cultivées sur de la gélose au sang et sur un milieu sélectif appelé milieu Chapman. Ces bactéries sont des mésophiles et préfèrent une température de croissance de 37 °C, elles sont neutrophiles avec un pH optimal de 7, et elles sont halophiles, ce qui signifie qu'elles peuvent se développer dans des concentrations élevées de NaCl (Aouati, 2009).

III.3. Caractères physiologiques et biochimiques

Les souches de *Staphylococcus aureus* présentent les caractéristiques suivantes : elles sont indole négatives, positives pour la production d'acétone, positives pour l'uréase, capables de réduire le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et elles produisent de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Aouati, 2009).

III.4. Caractères culturels

S. aureus se cultive facilement sur des milieux ordinaires, en aérobie comme en anaérobie ; sur milieu solide, il forme des colonies lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, bombées, opaques et parfois élabore un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange (d'où Staphylocoque doré) d'intensité variable selon les souches. En milieu liquide, il donne un trouble homogène. Sur le plan nutritif, il est peu exigeant (acide nicotinique et vitamine B1 indispensables) et tolère de grandes variations de conditions de croissance (Bourgeois et al., 1996 ; Guiraud et Rosec, 2004). Considéré comme étant une bactérie mésophile, il se cultive dans des températures de 7°C à 48°C avec un optimal de 30°C à 37°C et un pH de 4,2 à 9,3 avec un optimal de 7 à 7,5 (Le loir et al., 2003).

III.5. *Staphylococcus aureus* et les antibiotiques

Staphylococcus aureus est une bactérie hautement adaptable et l'un des agents pathogènes qui abritent des déterminants de la résistance acquise (Golla et al., 2020) et qui a devenu résistante aux antibiotiques. Deux ans, après le début de la production à grande échelle de la pénicilline, en 1942, des souches *Staphylococcus aureus* résistantes à cet antibiotique ont été isolées. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) a été observé en 1962 dont la méthicilline a été introduite en 1960 (Bayles, 2000; Zari et al., 2013).

Depuis lors, le SARM était devenu un problème important dans les établissements médicaux du monde entier (Conterno et al., 1998 ; Collignon et al., 2005), et il était considéré comme endémique dans la plupart des centres médicaux urbains (Shanson et al., 1982).

Cela également a conduit au développement de la vancomycine en 1972 et des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont apparus en 1988 (Uttley et al., 1988). Bien que la vancomycine soit restée un médicament de première intention pour le traitement des infections à SARM, des isolats de *Staphylococcus aureus* avec une résistance totale à celle-ci ont émergé (Cong et al., 2020).

IV. Genre *Bacillus*

IV.1. Caractères généraux et classification

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries à Gram positif, bien que les cultures vieilles puissent parfois apparaître à Gram négatif. Ils sont des bâtonnets droits avec une extrémité carrée ou arrondie, de tailles variables allant de 0,5 à 2,5 µm de largeur et de 1,2 à 10 µm de longueur. Leur pourcentage de GC varie de 32 à 69. La plupart du temps, ils sont mobiles grâce à des flagelles péritriches. Ils sont aérobies, bien qu'ils puissent parfois être facultatifs, et ils sont positifs pour le test de catalase (**Prescott et al., 2003**).

Le genre *Bacillus* renferme des espèces pathogènes des insectes comme *B. larvae*, *B. popilliae*, *B. lentimorbis*, *B. thuringiensis*. D'autres espèces pathogènes pour les animaux ; *B. cereus*, *B. circulans*, *B. anthracis*, ont été isolées des infections Humaines (**Todar, 2003**).

V. *Escherichia coli*

V.1. Généralités et classification

Escherichia coli est une espèce bactérienne largement présente dans la flore intestinale des animaux à sang chaud, où elle coexiste généralement de manière bénéfique pour l'hôte et le microorganisme (**Laarem et al. ; 2017**). Cependant, certains clones d'*E.coli* ont développé des caractéristiques de virulence qui leur permettent de coloniser l'hôte et de survivre à l'intérieur de celui-ci, entraînant potentiellement des maladies graves (**Mainil, 2013 ; Vaish et al., 2016 ; Abreu et Barbosa, 2017**). Cette bactérie est responsable de taux élevés de morbidité et de mortalité à travers le monde (**Cunha et al., 2017**).

La classification d'*E.coli* selon la seconde Edition de Bergey's of Systematic bacteriology (**2004**) est la suivante :

Phylum : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Escherichia*

Espèce: *Escherichia coli*

V.2. Les caractéristiques bactériologiques de l'espèce

E. coli est une bactérie en forme de bâtonnet ou de coccobacille, mesurant de 2 à 3 μm de longueur et 0,6 μm de largeur. Elle a une coloration de Gram négatif et est mobile grâce à une ciliature péritriche. Elle ne produit pas de spores et est encapsulée. Les colonies formées par cette bactérie ont un aspect bombé, lisse, homogène et de forme ronde avec des bords réguliers. Elles mesurent entre 2 et 3 mm de diamètre (**Joly et Reynaud, 2002 ; Vaish et al., 2016**).

La recherche des *E.coli* est couramment effectuée dans des circonstances variées. Une culture sur milieu ordinaire est facilement réalisable, compte tenu du fait qu'ils n'ont pas d'exigences particulières pour sa multiplication. Ils sont caractérisés par une croissance rapide à 37°C avec un temps de génération de 20 minutes (**Joly et Reynaud, 2002**).

E. coli possède un ensemble de caractères biochimiques discriminants, ce qui permet de la différencier d'une population microbienne hétérogène. Cette bactérie a la capacité de fermenter divers sucres (glucose, le lactose, mannitol et saccharose pour certaines souches) avec production d'acides organiques. Lors de la fermentation du glucose, il y a production de gaz. L'un des caractères discriminants d'*E.coli* est la production de l'indole à partir du tryptophane. Il est aéro-anaérobie facultatif, uréase négatif, tryptophane désaminase négatif, ne produit pas d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer négative) et n'utilise pas le citrate comme source de carbone. Il réduit les nitrates en nitrites, n'a pas d'oxydase mais possède une catalase (**Joly et Reynaud, 2002**).

I. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de Université Abderrahmane Mira – Bejaia. Le but de cette étude est d'apporter une contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des sept(07) souches de *Lactobacillus* à l'égard de *Staphylococcus aureus* SARM, *E.coli* et *Bacillus cereus*.

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Bactéries lactiques

Un total de 07 souches de *Lactobacillus* isolées de différentes niches écologiques, ont été testées dans cette étude (tableau I).

Tableau I : Souches de Lactobacilles utilisées et leurs codes

Lactobacilles	Code	Origine
Souche 01	3081	Alimentaire
Souche 02	PN	Humaine
Souche 03	Plant Ys	Humaine
Souche 04	1003	Humaine
Souche 05	8LB1	Alimentaire
Souche 06	5367	Alimentaire
Souche 07	BN(BL)	Alimentaire

I.1.2. Bactéries pathogènes

La souche pathogène utilisée est d'origine Humaine et environnementale. Il s'agit de 3 souches *Staphylococcus aureus* SARM, 3 souches de *Bacillus cereus* et trois autres d'*Escherichia coli* d'origine marine.

I.2. Revivification et la purification des souches utilisées

Un repiquage de 2 à 3 colonies (de 48h) de chaque culture bactérienne des 07 souches de *Lactobacillus* dans 10ml de bouillon de MRS (Man Rogosa et Sharpe) et incubation à 37°C / 24h est réalisé. Le choix de 2 à 3 colonies est basé sur la standardisation des cultures bactériennes.

Pour les bactéries pathogènes le nombre de colonies repiquées varie d'une espèce à une autre. De 2 à 3 colonies dans 10ml de Bouillon Nutritif pour le SARM, et *E.coli* à une seule colonie pour *Bacillus cereus*. L'incubation est effectuée à 37°C / 24h.

Afin de vérifier la pureté de chacune des souches lactiques ainsi que les souches pathogènes ; une caractérisation macroscopique (description de l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides (taille ; pigmentation ; contour ; viscosité) ainsi qu'une caractérisation microscopique au grossissement ($G \times 100$) qui permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**) grâce à la coloration de Gram, est développée.

Un ensemencement en strie de culture de *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *E.Coli* et *Bacillus cereus* sur la gélose MRS et gélose nutritive respectivement, est réalisé, ensuite les boîtes sont incubées à 37°C/24h.

I.3.-Recherche de l'activité antimicrobienne

I.3.1.Tests d'activité antimicrobienne

Cette activité est déterminée en réalisant le test des spots et le test des puits (méthode de Barfoot et Klaenhammer, 1983)

I.3.2. Test des spots (Antagonisme direct)

L'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* vis à vis des souches pathogènes cibles est mise en évidence grâce au test d'antagonisme direct, appelé : test des spots (**Schillinger et Luke 1989**).

Après avoir coulé la gélose MRS dans des boîtes de Pétri, une fois solidifiée et séchée, 5µl de culture fraîche (10^8 UFC/ml) de chaque souche lactique obtenue après 18h d'incubation sur bouillon MRS, sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées à température ambiante pendant 30 min ensuite sont incubées à 37°C pendant 24h. Après croissance des spots, des cultures fraîches de 1ml de souches cibles de charge de 10^8 UFC/ml ont été ensemencé dans 9 ml de gélose Muller Hinton en surfusion et coulé sur gélose MRS contenant les spots. Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 24h. Un témoin négatif est également réalisé pour chaque souche cible. Ce test est répété 3 fois pour chaque souche cible. L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition des zones claires autour des spots, les résultats

sont considérés positifs si la zone dépasse 2mm de diamètre (Hernandez et al., 2005). Le diamètre est mesuré en millimètre (figure 01).

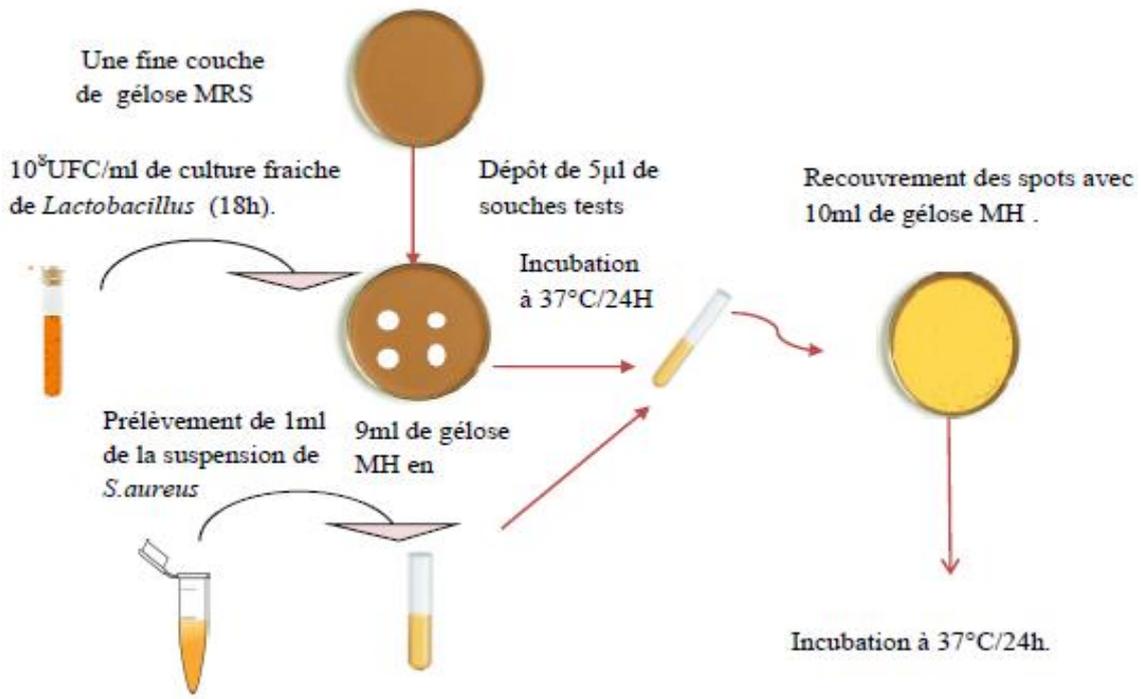


Figure 01 : Schéma représentatif du test de spot

I.3.3. Test des puits

Le test des puits est réalisé afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des souches lactiques à l'égard de *S.aureus*. Il consiste à mettre en contact le surnageant de la souche lactique avec la souche cible. Ce test est réalisé en utilisant des cultures bactériennes de 18h (culture fraîche), avec surnageant natif et neutralisé (figure 02).

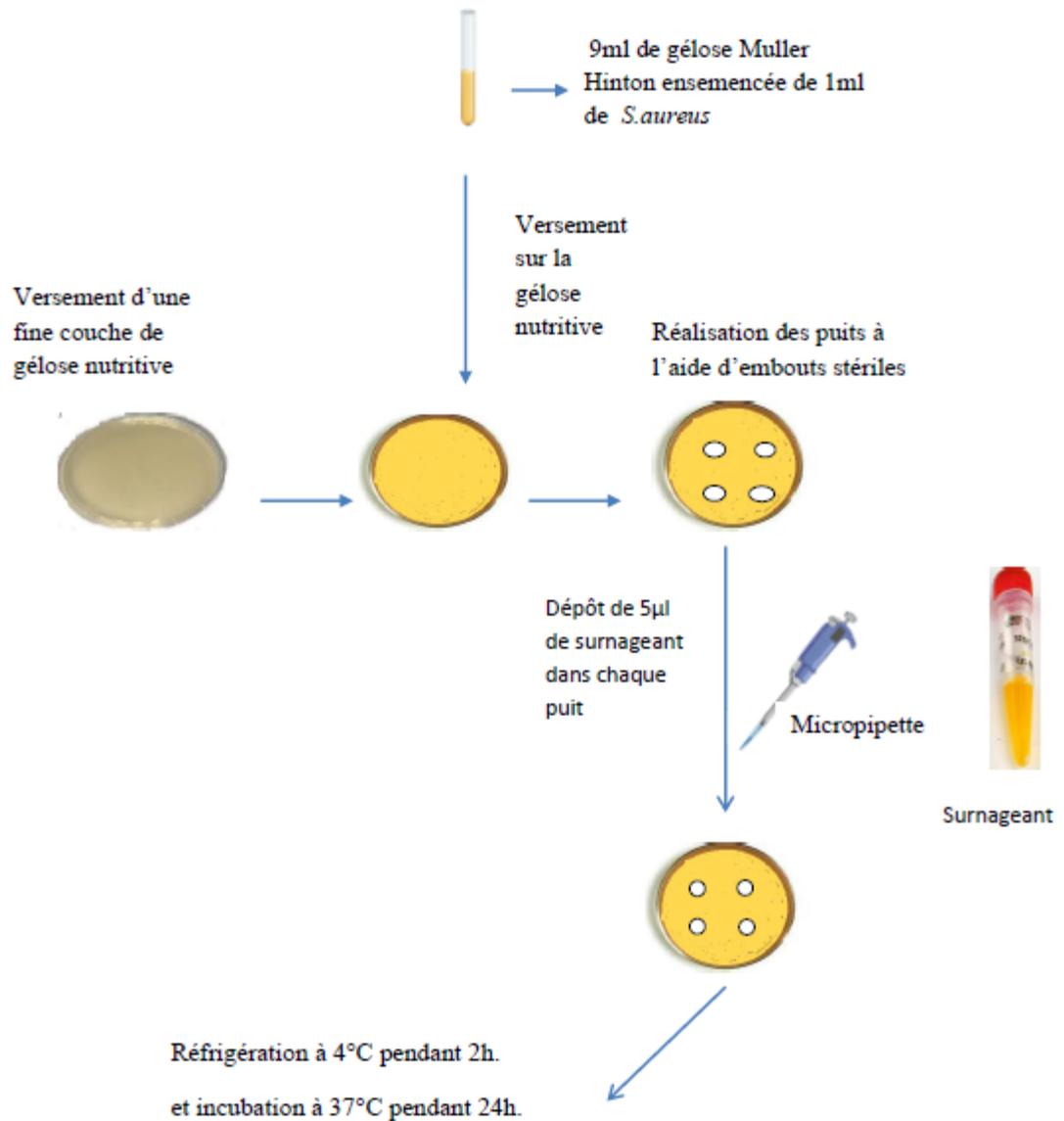


Figure 01 : Schéma représentatif du test de puits

a) Test des puits avec le surnageant natif

Une fine couche de gélose nutritive est déposée au fond des boîtes Pétri stériles. Après solidification, 10ml de gélose Muller Hinton en surfusion est préalablement ensemencée par la souche cible (10^7 UFC/ml) sont versés. Après solidification, 4 puits ont été réalisés dans chaque boîte à l'aide d'embouts stériles (chaque puits correspond à un surnageant de souche lactique et un puits pour le témoin). Deux boîtes de Pétri ensemencée par la même souche pathogène sont préparées. Les puits sont scellés avec une goutte de gélose nutritive, ensuite

remplis de 100µl de surnageant natif de chaque souche lactique obtenu après centrifugation à (8000tours/10min) et filtration l'aide de filtres à seringues de 0,22µm de porosité. Les boites sont ainsi entreposées délicatement au réfrigérateur à 4°C pendant 2h à fin de permettre une diffusion des éventuelles substances présentes dans le surnageant. Après ce temps, les boites sont incubées à 37°C pendant 24h. Le test est refait 3 fois pour chaque souche cible.

b) Test des puits avec le surnageant neutralisé

Le surnageant est neutralisé afin d'éliminer l'effet du pH qui est dû à la production des acides organiques notamment l'acide lactique et l'acide acétique, par les souches lactiques. La neutralisation est effectuée toute en ajoutant de la base NaOH de 1N au surnageant obtenu après centrifugation dans le but d'avoir un pH d'environ 6,5 à 7 (**Kimet *al.*, 2001; Labioui et *al.*, 2005**), le test s'est effectué suivant les étapes décrites précédemment(**I.7.2.a**).

L'activité antimicrobienne des souches lactiques se manifeste par la présence de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres des zones apparues sont mesurés en millimètres. Les résultats sont considérés positifs si le diamètre est supérieur à 2 mm (**Tabak et Bensoltane, 2011**).

II.2.2. Aspect microscopique

L'observation d'un frottis coloré avec la coloration de Gram au microscope optique, permette de décrire le Gram, la forme des cellules de souches bacilles et leur mode d'association.

Cette observation nous a révélé que toutes les souches sont Gram positifs (couleur violet). D'autre part, nous a permis de distinguer la morphologie des bactéries lactiques qui se présentent sous forme des bacilles plus ou moins longues, ces formes sont disposées en paires, en chaînes de différentes longueurs ou en singulier simple.

Cependant les *Staphylococcus aureus* sont présentés sous forme des cocci disposés en amas, en grappe de raisin et sont à Gram positifs, *E.coli* se présente sous forme de petit bacille de Gram négatif et *Bacillus cereus*, sous forme de grand bacille rectangulaire.

II.3. Tests d'activité antimicrobienne

II.3.1. Test des spots

Les résultats de test des spots ont révélé une importante activité antimicrobienne des souches de *Lactobacillus* vis-à-vis des souches cible de bactéries pathogènes qui se traduit par l'apparition des zones d'inhibition autour des spots. Les diamètres des zones d'inhibition varient de 09 à 32 mm (figure).

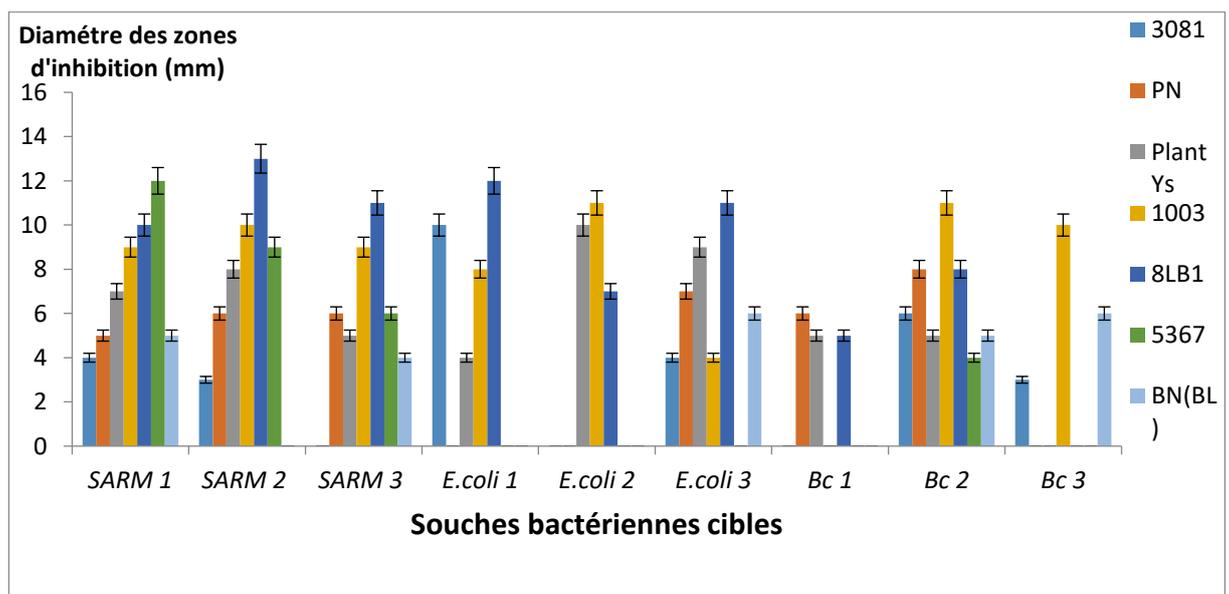


Figure 05: Diamètres des zones d'inhibitions (en millimètres) résultants du test des spots de *Lactobacillus* à l'égard des souches de bactéries pathogènes.

- Toutes les souches des bactéries lactiques ont présenté une activité antagoniste contre toutes les souches cibles pathogènes. *Cependant*, leur spectre d'activité sont très variés, dont ;
- La meilleure zone d'inhibition est apparue avec la souche *E.coli* 1 en interaction avec la souche *Lactobacillus* 3081 dont le diamètre est de 32 mm.

Les études de **Makras et al., (2006)**, ont déjà confirmé l'activité antagoniste des LAB contre les bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus* ainsi que l'inhibition de ses dernières par les *Lactobacillus* particulièrement *Lactobacillus plantarum* (**Mami et al., 2010**) dont ils ont démontré l'activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

De ce fait, Le pouvoir antagoniste obtenu dans nos résultats peut être dû aux différents métabolites produits par les souches *Lactobacillus* selon **De kim et al (1994)**. Un tel antagonisme bactérien pourrait résulter des effets combinés de plusieurs mécanismes au cours de leur croissance. Ceux-ci peuvent comprendre : la production d'acide lactique conduisant à une diminution du pH et la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), tous deux connus être inhibiteurs contre Gram+ et Gram-, compétition pour les nutriments disponibles, production de protéines spécifiques appelées bactériocines (**Fang et al.,2007**) .

A noter que l'acide lactique est le métabolite principal de bactéries lactiques causant la réduction du pH qui inhibe largement de microorganismes (**Eklund,1989 ; Schnurer et Magnusson, 2005**). **Hicks et Goepfert (1968)** ont bien confirmés que l'acide lactique et l'acide acétique produit par les bactéries lactiques participent à l'inhibition de *Staphylococcus aureu ?s*. En outre, la croissance de certaines cultures lactiques entraine la production de peroxyde hydrogène (H_2O_2) qui est considéré comme un inhibiteur de la croissance bactérienne (**Julliard et al., 1987**). *Cependant ;* cet agent peut-être dégradé par une enzyme, la catalase, présente chez certaines espèces bactérienne tel que *S.aureus*. De plus, l'activité inhibitrice dans ce test est majeure en raison de la production continue des métabolites tant que les cellules sont toujours présentes et vivantes.

Afin de prouver que le pouvoir antagoniste est dû aux métabolites produites (essentiellement bactériocines like) par les souches de *Lactobacillus*, on procède au test des puits (méthode de **Barfoot et al., 1983**)

I.3.2. Antagonisme indirect

➤ Test des puits

Après une incubation de 24 heures à 37°C, les résultats obtenus démontrent que les surnageant de Lb présentent une activité contre les neuf souches cibles. Cela se manifeste par la formation de zones claires autour des puits, indiquant l'absence de croissance de la souche cible.

➤ Cas de surnageant natif :

Après 24 heures d'incubation, la majorité des souches de bactéries lactiques étudiées ont démontré une activité inhibitrice variable avec un diamètre 5 à 15 mm envers *E.coli* et de 6 à 14 mm envers *S. aureus* et de 4 à 15 mm contre les *Bacillus cereus*. Cela est dû à la présence des composés antimicrobiens tels que les bactériocines, les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène produire par les lactobacilles (figure).

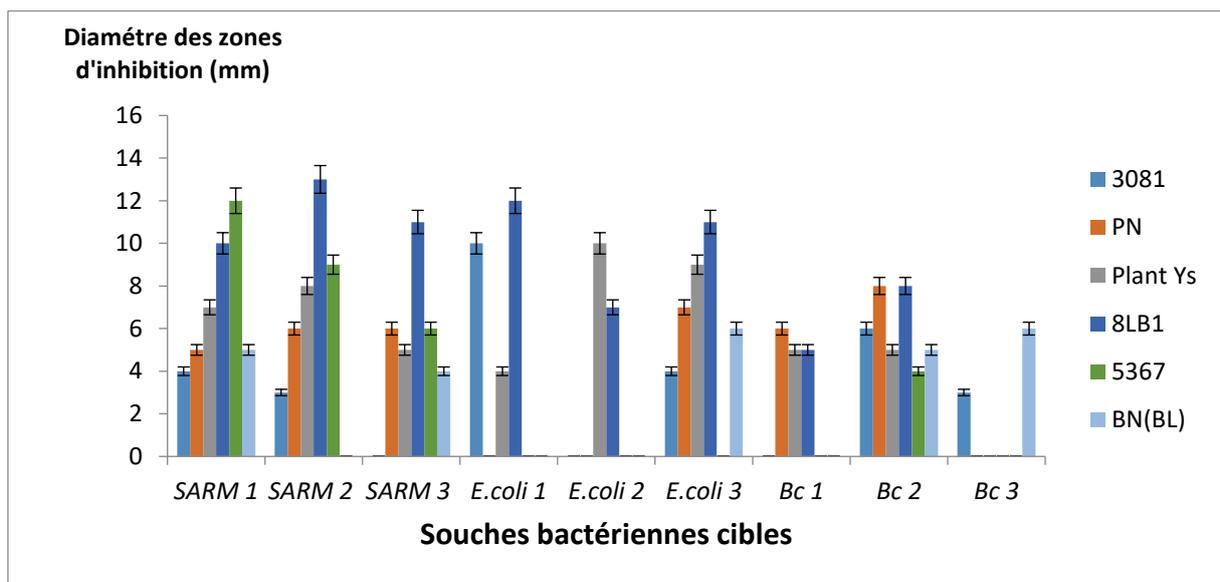


Figure 06: Diamètres des zones d'inhibitions (en millimètres) résultants du test des spots de *Lactobacillus* à l'égard des souches de bactéries pathogènes.

➤ Cas de surnageant neutralisé

Après avoir ajusté le pH des surnageant de culture des souches lactiques à 6,5, aucune activité antibactérienne n'était observée contre *Escherichia coli*, ceci laisse penser que cette activité serait probablement due aux acides organiques, en particulier les acides lactique et acétique, qui ont un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ou à des

substances actives qui ne sont efficaces qu'à un pH acide (De Vuyst et Vandamme, 1994). De plus, l'acidité reste le principal inhibiteur chez les bactéries lactiques,

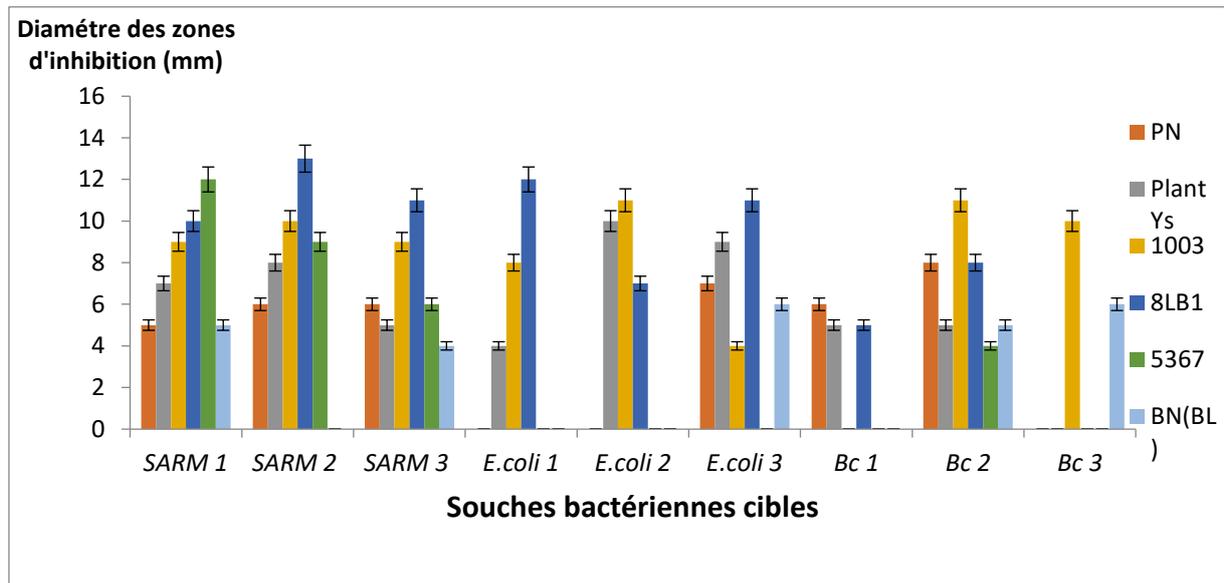


Figure 07: Diamètres des zones d'inhibitions (en millimètres) résultants du test des spots de *Lactobacillus* à l'égard des souches de bactéries pathogènes.

Selon **Dortu et Thonar (2009)**, on pourrait expliquer cela par :

- La présence de quantités réduites de bactériocines produites
- il est possible que l'activité antibactérienne précédemment observée soit attribuable à des bactériocines qui se sont fixées sur la paroi bactérienne.

Selon une étude réalisée par **Yüksekdağ et al. (2004)**, l'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène est attribué à son pouvoir d'oxyder les groupes sulfhydriques, ce qui entraîne la dénaturation de plusieurs enzymes. Cette dénaturation limite la croissance des bactéries pathogènes.

Conclusion

Dans cette étude 07 souches lactiques, isolées de plusieurs niches écologique, ont été testées quant à leurs activités antibactérienne à l'égard d'*Escherichia coli* (*E.coli* 1, *E.coli* 2, *E.coli* 3), *Staphylococcus aureus*(SARM 1, SARM 2 , SARM 3) et *Bacillus céreus* (Bc1, Bc2, Bc3) .

Avant d'évaluer l'activité de ces souches, nous avons réalisé des tests utilisant des cellules bactériennes dans le test des spots, ainsi que leurs surnageant dans les tests des puits et des disques.

Les résultats obtenus dans les tests des spots ont révélé une importante activité antimicrobienne vis-à-vis des souches d'*E.coli* avec des zones d'inhibitions distinctes dont le diamètre variait entre 23 à 27 mm

L'activité antibactérienne a évaluée par l'application du test des puits et des disques dans le but de déterminer la nature de cette activité , par l'utilisation de surnageant natif et neutralisé ,alors les résultat obtenue démontrent que les surnageants natifs de Lb présente exercent une activité contre les neuf souche pathogène , cela est due à la présence des composé antimicrobiennes tels que les bactériocines , les Acides organiques et le peroxyde d'hydrogène dans les surnageant des souches de Lb, dans le cas de surnageant neutralisé , aucune activité n'est observé contre *E.coli*, cela laisse pensé que cette activité serait probablement due aux acides organiques , en particulier Ac lactique et Ac acétique qui ont un effet inhibiteur sur les bactéries, ou à des substances actif qui ne sont efficace qu'à ph acide ,et pour *S.aureus* et *Bacillus* , on remarque qu'il y a une activité même avec le surnageant neutralisé donc cela peut être due à la présence d'autre substance antimicrobiens comme les bactériocines et le peroxyde d'hydrogène

Les résultats obtenus indiquent que les souches de *Lactobacillus*, isolées de diverses niches écologiques, ont un effet inhibiteur sur la croissance des souches pathogènes. En d'autres termes, ces souches de *Lactobacillus* ont démontré des propriétés antimicrobiennes contre les agents pathogènes testés.

Cependant, les résultats de cette étude sont préliminaires, et des recherches plus approfondies sont nécessaires pour parvenir à des conclusions définitives.

Références bibliographique

Allouche F.N., Hellal A., Laraba A., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne des Souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, 3: 13-20.

Aouati H ,(2009) :Isolement des souches de *staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline . Etude de leur sensibilité aux autre familles d'antibiotiques , 81 P.

Bayles, K.W.(2000) The bactericidal action of penicillin: New clues to an un solved mystery. *Trends Microbiol.* **2000**, 8, 274–278. [CrossRef])

Badis A ., Laouabdia-Sellami N ., Guetarni D ., Kihal M ., Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences & Technologie C* (23) :30-37.

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

Bennik M.H.J., Overbeek W.V., Smid E.J., Gorris L.G.M., (1999) : Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 28: 226-232.

Belkhezi L.(2020): Les Lactobacilles: Rôle physiologique et intérêt en santé humaine . Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc, pp. 13-14.

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, Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 84p.

Bourgeois .C.M et Larpent .J .P (1996) : Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentations alimentaires .Tome 2, pp. 523 .

Catherine DelMAS ,(2015) : fiche Technique- Bactériologie .

Collignon P, Nimmo GR, Gottlieb T, Gosbell IB (2005). Australian Group on Antimicrobial Resistance. Staphylococcus aureus bacteremia, Australia. *Emerg Infect Dis*;11:554-61.)

Cong, Y.; Yang, S.; Rao, X (2020). Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features. *J. Adv. Res.* **2020**, 21, 169–176. [CrossRef]

Conterno LO, Wey SB, Castelo A (1998). Risk factors for mortality in Staphylococcus aureus bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*;19: 32-7)

CUNHA M. P. V., SAIDENBERG A. B., MORENO A. M., FERREIRA A. J. P., VIEIRA M. A. M., GOMES T. A. T. et KNOOBL T. (2017). Pandemic extra-intestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. *PLoS One*12(6):e017897

Denis f., MCPoly., Martin ., Bengen E., Quentin R (2017): Bactériologie médicale technique usuelle .Elsevier Masson, 417 P.

Dortu C , 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.)

Golla, R.; Mishra, B.; Dang, X.; Lakshmaiah Narayana, J.; Li, A.; Xu, L.; Wang, G. (2020) Resistance of Staphylococcus aureus in response to human cathelicidin LL-37 and its engineered antimicrobial peptides. *ACS Infect. Dis.* [CrossRef] [PubMed]

Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p.)

Guessas B et Kihal M.(2004) : Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology.* 3 (6), 339-342.

Hang.C. H et Hang. L et Watanab .K et Li . S.W.(2018) : identification and classification for the lactobacilles

Iwona D., Malgorzata M., et Tadeusz T.,2013. Isolation and Identification of Microorganisms Including Lactic Acid Bacteria and their Use in microbial deacidification of wines from domestic vineyards, *Polish Journal of Microbiology.*

JOLY B. et REYNAUD A. (2002). Entérobactéries systématique et méthodes de diagnostic.

Joffin JN, Leyral G (2001). Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques, 3ème Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine.

Juillard V ., Spinnler H.E ., Desmazeaud J ., Boquien C.V. (1987).Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Lait, 67(2) : 149-172.

Kandler, O., and Weiss, N. (1986) Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology (8nd ed.)*. Baltimor. pp 208-1234.

Kashet, E.R. (1987). Bioenergetics of lactic and bacteria cytoplasmic pH and osmotolerance. FEMS MicrobiolRev.46 :233-244.

Kim J.W., Rajagopal S.N.,(2001). Antibacterial activities of *Lactobacillus crispus* ATCC33820 and *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. The Journal of Microbiology

LAAREM M., BARGUIGUA A., NAYME K., AKILAS A., ZEROUALI K., EL MDAGHRI N. et TIMINOUNI M. (2017).Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria. J Infect DevCtries11(2):143-151

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, 237-250

Laurent. S et Federighi .M et Jouve.J.L . (1998) :Manuel de bactériologies alimentaire .PP.308

LE LOIR Y. et BARON F et GAUTIER M. (2003) : *Staphylococcus aureus* and food poisoning. FUNPEC-RP, Genet.Mol.Res. (2) 1: 63-67

Luquet. F-M. (2008) : Bactéries lactiques de la génétique aux ferment . 11, rue Lavoisier F-75008 Paris : TEC.

Luquet. F-M.(1986) : Lait et produits laitiers : vache, brebis , chèvres . Tome 3 .

Luquet, F. M., H de Roissart .(1994) . Bactéries lactique : p. 52 ;

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I, Lou, Y.,

Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muñoz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, G., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., & Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616.)

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, 2010, volume 5, N° 21.

Makhloufi KM. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. PhD Thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Paris, p. 228.)

MAINIL J. (2003) : Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : II) Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Médecinevétérinaire*147 : 159-171.

Mechai . A ,(2009) : Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar- Annaba.

Menard J-P et Bretelle F. (2012) :Vaginose bactérienne et accouchement prématuré. *Gynécologie Obstétrique et fertilité*, 40, 48-54 P.

Milani L.I.G., Fries L.I.M., Boeira L.S., Melo V. Terra N.N., (1998) :Bioprotection of frankfurter sausages. *Acta. Alimentaria*, 27, 221-229.

Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.(2010). Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université .)

Prescott ,L.M., Harley, J.P.et Klein, D et woolverton C J. (2003). Microbiologie. Edition De boeck Ed. 2ième édition française, 525-526PP.

Shanson DC, Kensit JC, Duke R. (1982) Outbreak of hospital infection with a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin and methicillin. Lancet **1976**; 2:1347–8.) & (Wenzel RP. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med; 97:440–2.)

Schillinger U., Lucke F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied Environmental Microbiology, 55, 1901.

Tabak S., Bensoltane A., 2011. 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 et Technologie, (6), 71-79.

Tahlaiti H. 2019. Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté: Microbiologie. Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie, pp.16-17

Todar, k. (2003). Online textbook. Emeritus, University of Wisconsin-Madison. Department of bacteriology.

Uttley, A.H.; Collins, C.H.; Naidoo, J.; George, R.C. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet **1988**, 331, 57–58. [CrossRef])

VAISH R., PRADEEP M., SETTY C. and KANDI V. (2016).Evaluation of Virulence Factors and Antibiotic Sensitivity Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Extra intestinal Infections. Cureus 8(5): e604. VIDIC J., MANZANO M., CHANG C-M.and JAFFREZIC-

Yüksekdağ Z., Beyatli Y., Aslim B., 2004. Determination of some characteristics of coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. Journal of Food Science and Technology, 37, 663-667.

Za_ri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L.H (2013): History of antibiotics: From fluoroquinolones to daptomycin (Part 2). J. Investig. Surg. **2013**, 26, 167–179. [CrossRef] [PubMed].)

Zohri W, et Khoubzi S , (2019) : Etude du potentiel probiotique de *Lactobacillus* isolées du lait de chamelle : Microbiologie appliqué .Mémoire de magister, Université de Biskra, Algérie, p 15-1.

Les annexes

1-Milieu de culture

MRS (bouillon)

- peptone.....10g
- extrait de viande10g
- extrait de levure5g
- Glucose.....20g
- Tween 80.....1ml
- Phosphate dipotassique2g
- Acétate de sodium.....5g
- Citrate trimmonique.....2g
- Sulfate de magnésium200mg
- Sulfate de manganèse50mg

MRS (gélose)

- peptone.....10g
- extrait de viande 8g
- extrait de levure5g
- Glucose.....20g
- Acétate de sodium trihydraté5g
- Tween 80.....1ml
- Hydro gèno-phosphate de potassium2g
- Sulfate de magnésium heptahydraté0.2g
- Sulfate de manganèse tétrahydraté.....0.05g
- Agar.....10g

Muller Hinton

- Infusion de viande de bœuf300ml
- Peptone de caséine.....17.5g

- Amidon de maïs.....1.5g
- Agar17g

Bouillon nutritif

- Extrait de viande1g
- Extrait de levure2.4g
- Peptone5g
- Chlorure de Sodium.....5g
- Eau distillée1L

Gélose nutritif

- Peptone10 g
- Extrait de viande ou d'extrait de levure 5 g
- chlorure de sodium 5 g
- Agar 15 g

2-Coloration de gram :

Technique

La première étape consiste en la préparation du frottis, qui se fait comme suit :

- Sur une lame propre déposer une goutte d'eau distillée ;
- Prélever à partir d'une culture pure (enrichissement sur DCLS pure) quelques colonies ;
- Bien les délayer dans la goutte d'ED et les étaler en faisant en sorte d'obtenir une monocouche homogène;
- Procéder à un séchage en faisant un geste de vas et viens au-dessus de la flamme ; - Une fois séchée, retourner la lame et là faire passer 3 à 4 fois dans la flamme par un geste rapide pour bien fixer les cellules bactériennes ;

La deuxième étape consiste en la réalisation de la coloration elle-même, elle est réalisée comme suit:

- Appliquer le premier colorant qui est le violet de gentiane, laisser agir 1min et rejeter ;

- Ajouter lugol, laisser agir pendant 45 secondes puis rejeter l'excès (sans rincer avec l'eau). - Rajouter une deuxième fois le lugol ; laisser agir 45 secondes et rejeter l'excès
- Mettre l'alcool goutte-à-goutte et laisser agir exactement pendant 30 secondes ; - Rincer abondamment pour enlever toute trace d'alcool ;
- Appliquer le deuxième colorant : quelques gouttes de fuschine et laisser agir 1min puis rincer et sécher

Lecture : Une observation microscopique à l'immersion (Gx1000) est réalisée, afin de déterminer le type de Gram des bactéries étudiées : si ces dernières apparaissent roses elles sont dites : Gram-, par contre si elles sont colorées en violet se sont des Gram+ .

3-Le test de catalase

- Prélèvement : Prélevez une petite quantité de culture bactérienne à tester.
- Ajout de peroxyde d'hydrogène : Déposez une ou deux gouttes de peroxyde d'hydrogène (3 %) sur la culture bactérienne.
- Observation : Regardez attentivement la réaction. Si la catalase est présente, des bulles d'oxygène se formeront, indiquant la décomposition du peroxyde d'hydrogène.
- Interprétation : Une réaction positive avec des bulles d'oxygène indique la présence de catalase, tandis qu'une réaction négative suggère son absence.

Résumé

Dans cette étude 07 souches lactiques, isolées de plusieurs niches écologique, ont été testées quant à leurs activités antibactérienne à l'égard d'*Escherichia coli* (*E.coli* 1, *E.coli* 2, *E.coli* 3), *Staphylococcus aureus*(SARM 1, SARM 2 , SARM 3) et *Bacillus céreus* (Bc1, Bc2, Bc3) .avant d'évaluer l'activité de ces souches, nous avons réalisé des tests utilisant des cellules bactériennes dans le test des spots, ainsi que leurs surnageant dans les tests des puits et des disques. les résultats obtenus dans les tests des spots ont révélé une importante activité antimicrobienne vis-à-vis des souches d'*E.coli* avec des zones d'inhibitions distinctes dont le diamètre variait entre 23 à 27 mm, l'activité antibactérienne a évaluée par l'application du test des puits et des disques dans le but de déterminer la nature de cette activité , par l'utilisation de surnageant natif et neutralisé ,alors les résultat obtenue démontrent que les surnageants natifs de *Lb* présente exercent une activité contre les neuf souche pathogène , cela est due à la présence des composé antimicrobiennes tels que les bactériocines , les Acides organiques et le peroxyde d'hydrogène dans les surnageant des souches de *Lb*, dans le cas de surnageant neutralisé , aucune activité n'est observé contre *E.coli*, cela laisse pensé que cette activité serait probablement due aux acides organiques , en particulier Ac lactique et Ac acétique qui ont un effet inhibiteur sur les bactéries, ou à des substances actif qui ne sont efficace qu'à ph acide ,et pour *S.aureus* et *Bacillus* , on remarque qu'il y a une activité même avec le surnageant neutralisé donc cela peut être due à la présence d'autre substance antimicrobiens comme les bactériocines et le peroxyde d'hydrogène, les résultats obtenus indiquent que les souches de *Lactobacillus*, isolées de diverses niches écologiques, ont un effet inhibiteur sur la croissance des souches pathogènes. En d'autres termes, ces souches de *Lactobacillus* ont démontré des propriétés antimicrobiennes contre les agents pathogènes testés.cependant, les résultats de cette étude sont préliminaires, et des recherches plus approfondies sont nécessaires pour parvenir à des conclusions définitives.

Mot clé : *Lactobacillus*, bactéries lactiques, Bactéries pathogènes, Activité antibactérienne

Abstract

In this study, 7 lactic acid strains, isolated from various ecological niches, were tested for their antibacterial activities against *Escherichia coli* (*E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 3), *Staphylococcus aureus* (MRSA 1, MRSA 2, MRSA 3), and *Bacillus cereus* (Bc1, Bc2, Bc3). Before evaluating the activity of these strains, we conducted tests using bacterial cells in the spot test, as well as their supernatant in the well and disc tests.the results obtained in the spot tests revealed significant antimicrobial activity against *E. coli* strains, with distinct inhibition zones ranging from 23 to 27 mm in diameter. The antibacterial activity was evaluated by applying the well and disc tests to determine the nature of this activity, using native and neutralized supernatants. The results demonstrated that native supernatants of *Lactobacillus* strains exerted activity against all nine pathogenic strains. This activity was attributed to the presence of antimicrobial compounds such as bacteriocins, organic acids, and hydrogen peroxide in the supernatants of *Lactobacillus* strains. In the case of neutralized supernatants, no activity was observed against *E. coli*, suggesting that this activity is likely due to organic acids, particularly lactic acid and acetic acid, which have inhibitory effects on bacteria, or to active substances that are only effective at acidic pH. However, for *S. aureus* and *Bacillus*, it was noted that there was activity even with the neutralized supernatant, indicating the presence of other antimicrobial substances such as bacteriocins and hydrogen peroxide.the results indicate that *Lactobacillus* strains isolated from diverse ecological niches have an inhibitory effect on the growth of pathogenic strains. In other words, these *Lactobacillus* strains have demonstrated antimicrobial properties against the tested pathogens. However, the results of this study are preliminary, and further research is needed to reach definitive conclusions.

Keywords: *Lactobacillus* , Lactic acid bacteria, pathogens, antibacterial activity

