

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

Université de Mohammed Seddik Benyahia - de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la

Vie

Département de Microbiologie

Appliquée et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم : الميكروبيولوجيا التطبيقية

وعلوم التغذية

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme :

Master Académique en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne de *Lactococcus lactis* à l'égard des souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes isolées du lait cru de vaches

Membres de Jury

Président : Dr Bekka Fahima

Examineur : M^{me} Roula Sagia

Encadreur : Dr Ait meddour Amel

Présenté par :

M^{elle} Boudjelal Aya

M^{elle} Brahimi Soumia

Année Universitaire 2017 - 2018

Numéro d'ordre (bibliothèque):.....

REMERCIEMENTS

Nous tenons en premier lieu à remercier Allah qui nous a donné la volonté pour étudier et réaliser ce travail.

Un grand merci à notre encadreur Dr Ait meddour Amel pour son aide, ses encouragements, sa patience et ses conseils.

Nous remercions également le membre de jury composé de Dr Bekka F d'avoir accepté de présider le jury de soutenance et M^{me} Roula S d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos enseignants du département de Microbiologie Appliquée et des Sciences Alimentaires de l'université Mohammed Seddik Benyahia. Grace à vous nous avons acquis beaucoup de connaissances, d'informations durant notre cursus.

Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnel de Laboratoire de Microbiologie

Merci tout le monde

Aya et Soumia



Dédicaces

À mes chers parents que j'aime tant.

À ma sœur Ichrak.

À mes frères Amir et Sabil.

À ma grand-mère, mes oncles et mes tantes.

À mes cousins et mes cousines.

À ma camarade Soumia et sa famille.

À tous ceux qui me sont très chers.

AYÀ

Dédicaces

À mes très chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements, par leurs sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir.

À mes chère frères Zouhir, Mourad et Amine.

À ma chère sœur Nouzha et son époux Hamza.

À ma chère sœur Bisma.

À mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.

À ma camarade Aya, ainsi qu'à toute sa famille.

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

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

SOUMIA

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

B. : *Bifidobacterium*

BHI: Brain Heart Infusion

C + G: Cytosine+ Guanine

CA-SFM : Comite de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Da: Dalton

En. : *Enterococcus*

GRAS: Generally Recognized as Safe

L. : *Lactococcus*

Lb. : *Lactobacillus*

N : Normalité

P. : *Pseudomonas*

ppm : particules par million

S. : *Staphylococcus*

Str. : *Streptococcus*

UFC : Unité(s) Formant Colonies

Glossaire

Folliculite : est l'inflammation d'un ou de plusieurs follicules pileux formant une papulo-pustule.

Furoncle : est un abcès fermé, volumineux et douloureux, dû à un staphylocoque.

Impétigo : est une maladie de la peau caractérisée par la formation de petites vésicules.

Sinusite : Inflammation des muqueuses des sinus (cavités à l'intérieur des os) de la face.

Otite : est une inflammation de l'oreille.

Abcès bulleux : Qualifie une affection cutanée avec apparition de bulles.

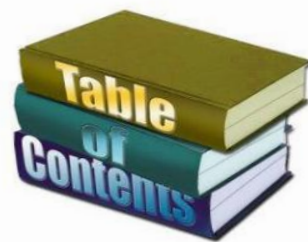
Endocardites aiguës : C'est une inflammation brutale du tissu qui tapisse l'intérieur des cavités cardiaques à la suite d'une infection par une bactérie ou un champignon.

Ostéomyélite : est une inflammation d'un os causée par des germes pathogènes.

Un phlegmon péri-néphrétique : est un abcès du rein constitué de tissu conjonctif et de graisse (tissu adipeux), situé à sa périphérie sur sa couche superficielle.

Maladie de Ritter du nouveau-né : est une maladie de la peau et de tissu cellulaire sous cutané dû à une infection par *Staphylococcus*. Dermatite exfoliative des nouveau-nés.

Sommaire



Sommaire

Liste des abréviations

Glossaire

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I. Généralité sur *Staphylococcus aureus*

1. Taxonomie et caractères généraux	3
2. Habitat	4
3. Pathogénicité	4
4. Principales pathologies.....	4
4.1. Chez les animaux (mammifères).....	4
4.2. Chez l'Homme	5
5. Toxi-infections alimentaires.....	5
6. Résistance aux antibiotiques	5
6.1. Inactivation d'antibiotique	5
6.2. Destruction de la molécule d'antibiotique	5
6.3. Modification de la cible d'antibiotique	6
6.4. Résistance par efflux actif	6

Chapitre II. Bactéries lactiques

1. Principales caractéristiques	7
2. Taxonomie et classification.....	7
2.1 Genre <i>Lactococcus</i>	8
3. Habitat	9
4. Effets positifs des bactéries lactiques sur la santé.....	9

Chapitre III. Antagonisme des bactéries lactiques

1. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques.....	11
1.1. Acides organiques	11
1.2. Peroxyde d'hydrogène.....	11
1.3. Dioxyde de carbone.....	11
1.4. Composés aromatiques.....	12
1.4.1. Diacétyle.....	12
1.4.2. Acétaldéhyde	12

Sommaire

1.5. Substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire	12
1.6. Bactériocines	12

Matériel et méthodes

1. Isolement des souches de <i>S. aureus</i>	14
1.1. Provenance des échantillons.....	14
1.2. Isolement	14
2. Purification	14
3. Identification	14
3.1. Etude macroscopique	15
3.2. Etude microscopique	15
3.3. Tests de la catalase	15
3.4. Test de la coagulase.....	15
4. Sélection des souches de <i>S. aureus</i> multirésistantes	15
5. Etude de l'activité antibactérienne d'une souche de <i>L. lactis</i> à l'égard des souches de <i>S. aureus</i> multirésistantes par le test des spots.....	16
5.1. Origine de la souche <i>L. lactis</i>	16
5.2. Test des spots	16
5.3. Mise en évidence des métabolites antibactériens de <i>L. lactis</i>	17
5.3.1. Test des puits	17
5.3.2. Test des puits après désorption	18
5.3.3. Test des puits après concentration du surnageant	18

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des souches de <i>S. aureus</i>	19
2. Identification	19
2.1. Etude macroscopique	19
2.2. Etude microscopique	19
2.3. Test de la catalase.....	19
2.4. Test de la coagulase.....	19
3. Sélection des souches de <i>S. aureus</i> multirésistantes	20
4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de <i>L. lactis</i> à l'égard de <i>S. aureus</i>	22
4.1. Test des spots	22
4.2. Mise en évidence des métabolites antibactériens	23
4.2.1. Test des puits	23
4.2.2. Test des puits après désorption.....	23

Sommaire

4.2.3. Test des puits après concentration du surnageant	24
Conclusion.....	26
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau I. Liste des antibiotiques testés	16
Tableau II. Résultats des antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i>	20
Tableau III. Diamètres des zones d'inhibition enregistrés par le test de spots	22
Tableau IV. Diamètres des zones d'inhibition enregistrés par le test des puits après désorption	23
Tableau V. Diamètres des zones d'inhibition enregistrés par le test des puits après concentration du surnageant.....	24

Liste des figures

Fig.1. Aspect morphologique de la souche de <i>S. aureus</i> observée au microscope électronique	3
Fig.2. Distances phylogénétiques entre les principaux genres constituant les bactéries lactiques basées sur les séquences des ARNr 16S.....	8
Fig.3. Schéma illustrant les étapes de réalisation du test des puits.....	17
Fig.4. Aspect microscopique des souches de <i>S. aureus</i> sous microscope optique après une coloration de Gram (x100).....	19
Fig.5. Antibiogrammes des souches de <i>S. aureus vis-à-vis</i> de 5 antibiotiques.....	21
Fig.6. Résultat du test de spots de <i>L. lactis vis-à-vis</i> des souches de <i>S. aureus</i>	22
Fig.7. Résultat du test des puits après désorption des substances antibactériennes de <i>L. lactis</i>	23
Fig.8. Résultat du test des puits après concentration (10x) du surnageant de <i>L. lactis</i>	25

Introduction

Introduction

Parmi les matières premières agricoles le « lait », ce dernier est à l'origine d'un grand nombre de produits très diversifiés. Cette diversité est liée à sa composition, mais également à l'intervention des microorganismes. En effet le lait est un milieu propice au développement des microorganismes, qu'ils soient d'intérêt technologique, neutres ou responsables d'altération voir même dangereux pour la santé humaine (**Michel et al., 2001**).

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et d'intoxications alimentaires, malgré l'application des technologies modernes de transformation des aliments, les toxi-infections alimentaires sont à la base de 6,5 à 33 millions de maladies humaines et plus de 9000 morts chaque année dans le monde (**Bayoub et al., 2010**). En 1997, à Caracas, une intoxication massive de 462 patients suite à la consommation de lait non pasteurisé a été confirmée. Les analyses ont montré, qu'il s'agissait de *Staphylococcus aureus* produisant les entérotoxines A et C (**Pasqualatto et al., 1998**). En Algérie, 18% des cas d'intoxications alimentaires recensés sont dus à la consommation de produits laitiers. L'espèce bactérienne la plus fréquemment incriminée dans les toxi-infections impliquant le lait cru et les produits laitiers demeure *S. aureus* (**De Buyser et al., 2001**).

Les antibiotiques ont été souvent utilisés pour éliminer les toxi-infections alimentaires (**Perreten et al., 1997**), cela a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique (**Perreten et al., 1997 ; Ouelhadj et al., 2017**). Pour faire face à ce problème des études sont orientées vers la recherche des substances naturelles (**Parada et al., 2007**).

Plusieurs microorganismes ont été découverts dans un contexte de santé humaine ou de sécurité sanitaire des aliments (**Charlier et al., 2009**). Parmi les, les bactéries lactiques qui sont généralement connues par un statut GRAS (**Parada et al., 2007**). L'inhibition des microorganismes 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* multirésistant (**Charlier et al., 2009**). *Lactococcus lactis* est largement utilisé dans l'industrie laitière et fromagère pour la production et la conservation des produits (**Miyoshi et al., 2004**), elle limite les contaminations des aliments par les germes indésirables (**Ho et al., 2018**). Cette capacité est liée à la synthèse des substances antibactériennes telles que les acides organiques et les bactériocines (**Khemariya et al., 2017 ; Tidona et al., 2018**). Ces dernières, peuvent inhiber la croissance de bactéries pathogènes et d'altération comme *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* et *S. aureus*.....(**Hernandez et al., 2005**), ce qui permis de prolonger la durée de conservation et d'améliorer la sécurité des produits alimentaires (**Saranraj et al., 2013**).

Introduction

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui consiste en l'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne de *L. lactis* vis-à-vis des souches de *S. aureus* multirésistantes isolées de lait cru de vaches saines et mammitesuses.

Ce manuscrit comporte deux parties :

La partie 1 consiste en une étude bibliographique portant sur le *S. aureus* et les bactéries lactiques.

La partie 2 consiste en une description des protocoles expérimentaux réalisés ainsi que les résultats obtenus. L'ensemble des résultats sera ensuite discuté pour aboutir à une conclusion générale et ouvrir sur de nouvelles perspectives.

Synthèse bibliographique



1. Taxonomie et caractères généraux

Sur la base d'analyses des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la Classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Staphylococcaceae* (Schleifer et Bell, 2009 ; Pellerin et al., 2009). Le genre *Staphylococcus* dispose de plus d'une trentaine d'espèces divisées en deux groupes selon leur aptitude à produire une coagulase. Actuellement six espèces de ce genre sont à coagulase positive *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. aureus* ssp. *aureus* et *S. aureus* ssp. *anerobius* (Lamprell, 2003 ; Al alam, 2008).

Les bactéries de l'espèce *S. aureus* sont des coques à Gram positif de 0,5 à 1,5 μm de diamètre, qui sont associées par paire, en chaînettes de 3 à 5 coques, ou en grappe de raisins (Fig. 1), leur paroi cellulaire est formée de trois constituants majeurs: le peptidoglycane composé d'unités répétitives de N-acétylglucosamine β -1-4 liées à l'acide N-acétylmuramique, des acides téchoïques au ribitol phosphates liés via des N-acétylmanosaminyl β -1-4-N-acétylglucosamine au muramyl-6-phosphate, et la protéine A, liée au peptidoglycane par liaison covalente (Sutra et al., 1998 ; Bhunia, 2018). La majorité des souches isolées d'infections humaines et animales produisent des polysides capsulaires qui forment des microcapsules non visibles en microscopie optique (Schleifer, 1983).

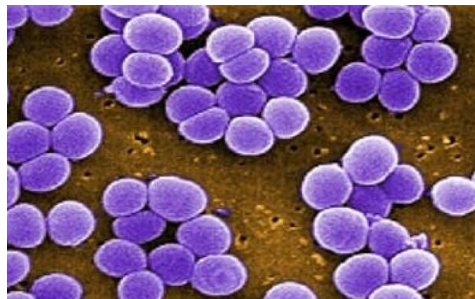


Fig.1. Aspect morphologique de la souche de *S. aureus* observée au microscope électronique (Leyral et Vierling, 2007).

S. aureus est chimioorganotrophe, de type respiratoire anaérobie facultatif, à oxydase négative et catalase positive. Sa croissance est plus rapide et plus abondante en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies. C'est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C (température minimale : entre 5 et 10°C ; température maximale : environ 45°C). Il est capable de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un pH optimal de croissance de 7 à 7,5. Il est halotolérant et peut se multiplier en présence de concentrations

élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10 %) (**Brisabois et al., 1997 ; Schleifer et Bell, 2009**).

La majorité des souches de *S. aureus* sont hémolytiques et produisent une ADNase ainsi qu'une coagulase qui coagule le plasma de lapin (**Lamprell, 2003**). Le génome de *S. aureus* est constitué par un chromosome circulaire d'environ 2800 paires de bases. Les gènes responsables de la virulence et de la résistance aux antibiotiques se trouvent aussi bien dans l'ADN chromosomique qu'extra-chromosomique. Ces gènes s'échangent entre souches, entre espèces ainsi qu'entre bactéries Gram positif par les éléments extrachromosomiques (**Lecornet, 2007**).

2. Habitat

Les souches de *S. aureus* sont très répandues dans la nature (air, eau, sol), ce sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et de l'animal. Cependant, le principal réservoir de cette bactérie reste l'Homme ; 15 à 40 % des adultes ont un portage nasal persistant de *S. aureus* à une densité de 10^3 à 10^4 UFC/cm², le reste de la population a un portage intermittent. A partir des sites de portage, *S. aureus* colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides (aisselles, périnée) et les mains (**Ateba et al., 2010 ; Vitale et al., 2017**).

3. Pathogénicité

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. Ces composés sont soit associés à la paroi de la bactérie (protéine A, récepteurs pour des glycoprotéines de l'hôte, polysides capsulaires), soit excrétés dans l'environnement de la bactérie (toxines, coagulase, enzymes) (**Sutra et al., 1998 ; Dayan et al., 2016 ; Crossley, 2016**).

4. Principales pathologies

4.1. Chez les animaux (mammifères)

Les principales pathologies dues à *S. aureus* en élevages sont les infections mammaires ou mammites chez les femelles en lactation (vache, brebis, chèvre). Chez la vache, les infections mammaires dues à *S. aureus* sont le plus souvent sub-cliniques et peuvent passer inaperçues, alors que chez la chèvre et la brebis, elles évoluent très souvent vers une forme gangreneuse. *S. aureus* est responsable de 20 à 40% des infections mammaires sub-cliniques chez la vache. La présence de *S. aureus* dans le lait, produit destiné à la consommation, représente un risque pour la santé humaine (**Ahmadi et al., 2010 ; Vitale et al., 2017**).

4.2. Chez l'Homme

C'est l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré dans les infections nosocomiales et suppuratives superficielles cutané-muqueuses telles que les folliculites, les furoncles, les impétigos, les sinusites et les otites. Il est responsable de septicémies à l'origine de localisations viscérales pleuropulmonaires (abcès bulleux), cardiaques (endocardites aiguës), ostéo-articulaires (ostéomyélites) ou urinaires (phlegmon périnéphrétique), de toxémies qui regroupent le syndrome de la peau ébouillantée (maladie de Ritter du nouveau-né) (Vincenot *et al.*, 2008).

5. Toxi-infections alimentaires

Une toxi-infection alimentaire staphylococcique (TIAS), est plutôt une intoxication due à l'ingestion d'une ou de plusieurs entérotoxines produites dans un aliment contaminé par un staphylocoque (García *et al.*, 2010). Les syndromes typiques associés aux TIAS apparaissent généralement 2 à 6 heures après ingestion et se traduisent par des vomissements avec ou sans diarrhées, crampes abdominales, généralement pas de fièvre quelque fois une légère hyperthermie ou bien au contraire une hypothermie. Des complications peuvent survenir en fonction de la dose de l'entérotoxine ou bien de la sensibilité de l'individu et de son état de santé : déshydratation, irritations musculaires, hypotension et état de choc (Zang et Stewart, 2001 ; Jay et Loessner, 2005).

6. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est très répandue chez *S. aureus* (Joo et Otto, 2015) grâce à sa flexibilité et sa plasticité génétique qui lui confère la capacité d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques (Dumitrescu *et al.*, 2010). Plusieurs mécanismes sont liés avec la résistance aux agents antimicrobiens chez *S. aureus* (inactivation d'antibiotique, destruction d'antibiotique, modification de la cible d'antibiotique et la résistance par efflux actif) (Quincampoix et Mainardi, 2001).

6.1. Inactivation d'antibiotique : se fait par l'ajout des fragments chimiques spécifiques aux molécules antimicrobiennes. Dans le cas de *S. aureus* résistant à la kanamycine, l'amikacine, tobramycine, nétilmicine et gentamicine, la résistance est induite par la présence d'une enzyme bi-fonctionnelle ayant des activités de phosphorylation et d'acétylation (Tankovic *et al.*, 1997 ; Munita et Arias, 2016).

6.2. Destruction de la molécule d'antibiotique : par la production d'une enzyme capable de dégrader la molécule antimicrobienne on note que *S. aureus* produit les β -lactamases. Ces enzymes détruisent la liaison amide de l'anneau β -lactame, rendant l'antibiotique inefficace (Quincampoix et Mainardi, 2001 ; Munita et Arias, 2016).

6.3. Modification de la cible d'antibiotique : les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline ont la capacité de modifier les protéines de la liaison à la pénicilline, ces protéines ont moins d'affinité pour les β -lactamines et en particulier pour la méthicilline, en conséquence diminuer l'attachement avec la paroi qui est la cible dans ce cas (**Quincampoix et Mainardi, 2001 ; Peacock et Paterson, 2015**).

6.4. Résistance par efflux actif : les pompes d'efflux sont des transporteurs protéiques qui minimisent l'accumulation d'antibiotique dans la cellule. Chez *S. aureus* NorA est une pompe responsable du transport des fluoroquinolones hydrophiles comme la norfloxacin et la ciprofloxacine (**Mesaros et al., 2005 ; Cattoir, 2004**).

1. Principales caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des cellules hétérotrophes et chimioorganotrophes, du point de vue morphologique, elles peuvent être réparties en trois groupes : coques, coccobacilles et bacilles. Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en (G+C) est inférieure à 55%. Ces bactéries sont asporulantes, aero-anaérobies facultatives ou microaérophiles, généralement immobiles, elles ne possèdent ni catalase (certaines possèdent une pseudocatalase) ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. (**Broadbent et Steele, 2005 ; Savadogo et al., 2006 ; Mokoena, 2017**). Elles sont généralement mésophiles, certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 5,5-6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel. Ces bactéries ont des besoins nutritionnels complexes en glucides fermentescibles, en acides gras, en acides aminés, en peptides, en vitamines et en minéraux (**Mokoena, 2017**). Selon le type de fermentation utilisé, les bactéries lactiques sont dites (**Sutra et al., 1998**):

- ❖ Homofermentaire : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- ❖ Hétérofermentaire : la fermentation du glucose abouti à la formation de l'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques (**Drouault et Corthier, 2001 ; Wassie et Wassie, 2016**).

2. Taxonomie et classification

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par un ensemble de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Phylogénétiquement elles appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales* (**Ludwig et al., 2009**). Traditionnellement le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > 50mol% et affecté au phylum des *Actinomyces*. Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques (**Klein et al., 1998**).

La première classification des bactéries lactiques par Orla-Jensen (1919) est basée sur la morphologie, l'écologie et les propriétés physiques (en particulier la température optimale de croissance), ainsi il les a classé en trois taxons : *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium* (**Matthias et Rudi, 2005**). En se basant sur le type fermentaire et sur la morphologie cellulaire, **de Roissart (1986)**, a classé ces dernières en quatre genres (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*) et 59 espèces. Cependant, l'application de techniques de biologie moléculaire pour

la détermination de relations phylogénétiques entre les bactéries lactiques a résulté en des changements significatifs dans leur classification taxonomique.

La relation phylogénétique entre les différents genres des bactéries lactiques (Fig. 2) est basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* et phylogénétiquement distinct.

15 nouveaux genres lactiques ont été décrits : *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Ignavigrnum*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus*, *Alkalibacterium*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*, *Granulicatella*. Le genre *Lactosphaera* a été reclassé comme appartenant au genre *Trichococcus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

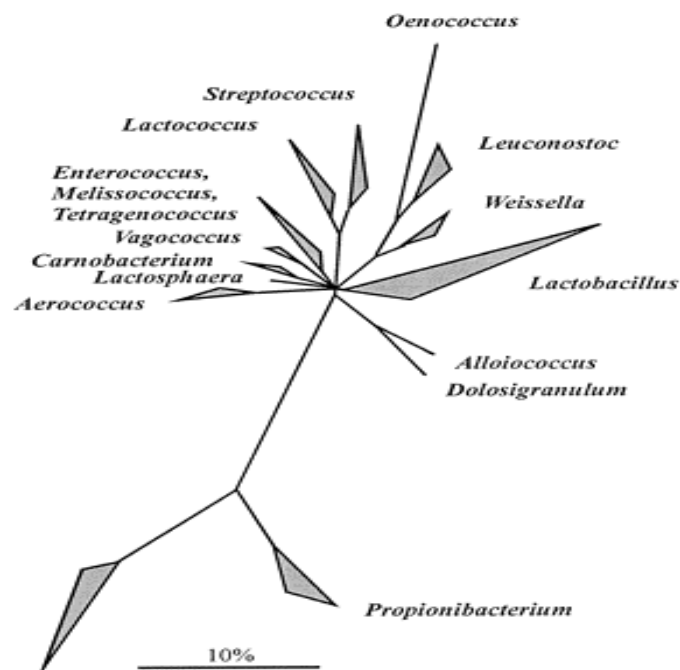


Fig. 2. Distances phylogénétiques entre les principaux genres constituant les bactéries lactiques basées sur les séquences des ARNr 16S. Adapté de Schleifer et Ludwig, (1995) (Holzapfel et al., 2001)

2.1. Genre *Lactococcus*

Les bactéries de ce genre appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*. Elles sont sous forme de coques ou ovoïde, rassemblées en diplocoques ou en chaînes de longueur variable (Mofredj et al., 2007 ; Laroute et al., 2017), homofermentaires, présentant des antigènes du groupe N, avec

une température minimale de croissance de 10°C et optimale de 30°C, ne peuvent pas croître en présence de 6,5 % de NaCl et à pH 9,6.

La taxonomie moléculaire des lactocoques a abouti à la différenciation de cinq espèces : *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum* et *L. picium*.

L. lactis englobe trois sous espèces et un biovar, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *hornieae*, *L. Lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Mofredj et al., 2007).

3. Habitat

Elles sont capables de croître dans des conditions environnementales variées, et sont ainsi retrouvées dans divers environnements tels que le tractus intestinal de nombreux animaux terrestres et aquatiques, les produits laitiers, les produits de la mer, ou encore certaines plantes (Ringo et Gatesoupe, 1998). D'une manière générale, les bactéries lactiques sont ubiquistes dans les aliments fermentés et non fermentés (Steinkraus, 1983 ; Soomro et al., 2002) et font partie de la microflore commensale de l'Homme (Adams, 1999).

4. Effets positifs des bactéries lactiques sur la santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé en 1907, par le russe Metchnikoff. Selon lui, les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale, en modifiant la microflore intestinale, et ainsi prolonger la vie. Depuis, un grand nombre d'études sur l'effet potentiel des bactéries lactiques sur la santé a été publié (Drouault et al., 2001). Les bactéries lactiques qui ont un effet positif sur la santé sont appelées probiotiques. Ces derniers sont définis comme étant « des microorganismes vivants, qui une fois consommés en des quantités adéquates, confèrent un bienfait pour la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2001).

Certaines bactéries lactiques sont utilisées dans la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses et des troubles digestifs liés à la prise d'antibiotiques (Hickson et al., 2007). Les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques constituent un problème fréquent qui touche environ 20% des patients hospitalisés (Bartlett, 1992).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'adhésion des bactéries lactiques au tractus digestif. L'idée générale est qu'une forte adhésion de ces bactéries à l'épithélium intestinal interférerait avec celle des agents pathogènes par saturation des sites de fixation. L'adhésion des bactéries lactiques à l'épithélium digestif a été étudiée *in vitro* avec des lignées cellulaires d'origine colique ou intestinale (Caco-2 et HT-29), animale (Schneitz et al., 1993), ou humaine (Chauvière et al., 1992). Certaines études ont montré que l'adhérence de *S. aureus* au mucus intestinal humain a été réduite de 39-40% par *Lb. rhamnosus* GG, *L. lactis* ssp. *lactis* et *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* (Vesterlund et al, 2006).

L'un des effets des bactéries lactiques qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'Homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose qui est due à une faible activité en lactase intestinale sur les entérocytes des villosités situées dans la bordure en brosse du jéjunum (**De Vrese et al., 2001**). Le lactose non digéré dans l'intestin grêle est fermenté dans le côlon conduisant à la production d'acides organiques à chaîne courte et de gaz tels que l'hydrogène, le méthane et le gaz carbonique. Ces produits présents en quantités excessives dans le côlon peuvent provoquer flatulences, spasmes intestinaux, douleurs abdominales, ballonnements et diarrhées osmotiques (**De Villiers, 1995**). **Marteau et al. (1990)**, ont montré que plus de 90% du lactose du yaourt est digéré chez des sujets déficients en lactase.

Plusieurs études rapportent que la concentration en cholestérol sérique diminue pendant la consommation de grandes quantités (680 à 5 000 ml par jour) de produits laitiers fermentés (**Bazarre et al., 1983**). **Gilliland (1990)**, a montré que plusieurs bactéries, notamment *Lb. acidophilus* et *B. longum*, sont capables de limiter le taux de cholestérol sanguin chez des porcs nourris avec un régime riche en cholestérol. Ces mêmes bactéries sont capables d'assimiler le cholestérol *in vitro* en présence de taurocholate de sodium, une partie de ce cholestérol assimilé (environ 20%) a notamment été retrouvée dans la membrane cellulaire de ces bactéries lactiques (**Zhang et al., 2008**). Certaines autres études ont montré que l'hydrolyse des sels biliaires par certaines bactéries lactiques conduirait à une réduction du cholestérol (**Liong et shah, 2005**).

1. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques

1.1. Acides organiques

Les bactéries lactiques sont sélectionnées pour leurs propriétés acidifiantes, phénomène déterminant dans l'inhibition des flores pathogènes (*S. aureus*, *Salmonella*, *Clostridium*) et des microorganismes d'altération (*Pseudomonas*, *Brochotrix* et les entérobactéries) (**Schillinger et Lücke, 1990**). Leurs propriétés inhibitrices sont attribuées à la production d'acides organiques, notamment lactique et acétique. L'effet inhibiteur de ces acides est étroitement lié à la diminution du pH du milieu et à la fraction d'acide non dissociée. La diminution du pH cause une acidification du cytoplasme cellulaire (**Kashket, 1987**), qui se traduit par une inhibition de la flore acido-sensible telle que *Pseudomonas* (**Talon et al., 1980**). La fraction acide non dissociée, étant lipophile, peut diffuser passivement à travers la membrane et dissiper le gradient électrochimique de protons ou altérer la perméabilité de la membrane ce qui engendrerait une perturbation des systèmes de transport de substrats (**Ammor et al., 2006**).

1.2. Peroxyde d'hydrogène

L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène résulterait de l'oxydation des groupes sulfhydryles causant une dénaturation d'un grand nombre d'enzymes. Il résulterait aussi de la peroxydation des lipides membranaires augmentant ainsi la perméabilité de la membrane (**Kong et Davidson, 1980**). H_2O_2 peut être aussi un précurseur de la production de radicaux libres bactéricides comme les ions superoxide (O_2^-) et hydroxyle (OH^-). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski et Gessner, 1988**). *Lb. paracasei* F2 produit 2,72 mmol/l d' H_2O_2 et il a été montré que la production de peroxyde d'hydrogène par des souches de *Lactobacillus* ou *Lactococcus* lors de cultures mixtes inhibait la croissance de *S. aureus* (**Otero et Nader-Macías, 2005**).

1.3. Dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies par inhibition des réactions enzymatiques de décarboxylation et l'accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique membranaire pourrait causer un dysfonctionnement dans la perméabilité (**Eklund, 1984 ; Baliarda, 2003**).

1.4. Composés aromatiques

1.4.1. Diacétyl : c'est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram positif (**Motlagh et al., 1991**).

1.4.2. Acétaldéhyde : il est produit par *Lb. delbruckii* ssp. *bulgaricus* par action d'une aldolase à thréonine, qui clive la thréonine en acétaldéhyde et glycine. Etant donné que *Lb. delbruckii* ssp. *bulgaricus* et *Str. thermophilus* ne métabolisent pas l'acétaldéhyde dans le yaourt, il s'accumule dans le produit. L'acétaldéhyde inhibe la croissance de *S. aureus* (**Piard et Desmazeaud, 1992**).

1.5. Substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire

Plusieurs études se sont intéressées à la production de substances antimicrobienne de faible poids moléculaire par les bactéries lactiques (**Reddy et al., 1983 ; Silva et al., 1987**). Ces substances partagent plusieurs caractéristiques, en plus d'avoir un faible poids moléculaire, elles sont actives à bas pH, solubles dans l'acétone, thermostables et montrent un large spectre d'activité (**Axelsson, 1990**). Jusqu'ici, trois substances ont été décrites, Reutéline et Reutélicycline, toutes les deux sont produites par *Lb. reuteri* et le 2-Pyrrolidone-acide 5-carboxylique, produit par *Lb. casei* ssp. *casei*, *Lb. casei* ssp. *pseudoplantarum* et *Str. bovis* (**Huttunen et al., 1995**).

1.6. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides ou des complexes de peptides (généralement 30 à 60 acides aminés) synthétisés au niveau des ribosomes et qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique sur d'autres espèces taxonomiquement proches (**Klaenhammer, 1988 ; Garneau et al., 2002**). Dans tous les cas, la cellule productrice est immunisée vis-à-vis de l'action de sa propre bactériocine. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont été classées par **Klaenhammer (1993)** en quatre classes sur la base de leur poids moléculaire, thermostabilité, sensibilité enzymatique, présence d'acides aminés post-traductionnellement modifiés et mode d'action (Classe I, II, III et IV) (**Oscariz et Pisabarro, 2001 ; Nigutova et al., 2007**).

Matériel et Méthodes



Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Mai-Juin 2018.

Le but de travail s'articule autour des points suivants :

- ☞ Isolement des souches de *S. aureus* à partir de lait cru de vaches saines et de vaches mammites après traitement aux antibiotiques.
- ☞ Identification phénotypique et biochimique des souches de *S. aureus* isolées,
- ☞ Test de résistance/sensibilité des souches aux antibiotiques,
- ☞ Mise en évidence d'un pouvoir antibactérien d'une souche de bactérie lactique, *L. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* isolées.

1. Isolement des souches de *S. aureus*

1.1. Provenance des échantillons

1 échantillon de lait de vaches saines et 1 échantillon de lait de vaches mammites (après traitement aux antibiotiques) sont aseptiquement collectés à partir d'une ferme dans la région de Mila. Ces derniers sont immédiatement transportés dans une glacière puis analysés au laboratoire.

1.2. Isolement

1 ml de lait est ensemencé dans des tubes contenant 9 ml de milieu Giolitti et Cantoni (annexe I) additionné de tellurite de potassium, puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. Après noircissement du bouillon, un ensemencement par stries sur la gélose Chapman (annexe I) est réalisé. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h.

2. Purification

Après incubation, les colonies sont sélectionnées sur la base de leur caractères cultureux (couleur jaune doré, bords réguliers, bombées, luisantes et un diamètre de 1 à 3mm) (**Sutra et al., 1998**). 3 colonies caractéristiques sont prélevées de chaque boîte et purifiées. La purification est effectuée par 3 repiquages successifs sur géloses Chapman avec vérification de la pureté des isolats après chaque repiquage en effectuant une coloration de Gram et un test de la catalase (**Guiraud, 1998**).

3. Identification

L'identification des souches de *S. aureus* est réalisée par l'utilisation de 4 tests principaux : étude macroscopique, étude microscopique, test de la catalase et test de la coagulase.

3.1. Etude macroscopique

L'examen macroscopique permet de déterminer l'aspect des colonies obtenues sur gélose Chapman en tenant compte les critères suivants : la taille, la forme, le contour et la couleur des colonies (Guiraud, 2003).

3.2. Etude microscopique

L'observation microscopique après une coloration de Gram permet de déterminer le type de Gram, la forme, et le mode de regroupement des cellules bactériennes.

3.3. Tests de la catalase

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par la souche, sa recherche consiste à mettre en contact une colonie en présence de l'eau oxygénée. La présence d'une catalase se traduit en quelques secondes par la formation de bulles gazeuses (Guiraud, 2003).

3.4. Test de la coagulase

A partir des colonies caractéristiques sur gélose Chapman un ensemencement d'un bouillon BHIB (cœur cerveau/ annexe I) est réalisé puis incubation à 37°C pendant 24 h. 0,5 ml de plasma humain sont répartis dans des tubes à hémolyse stériles, puis 0,5 ml de chaque bouillon BHIB présentant un trouble sont stérilement ajoutés. Les tubes sont mélangés au vortex puis incubés à 37°C. L'observation se fait toutes les heures pendant 8 heures puis au bout de 24 h. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum (Guiraud et Rosec, 2004).

4. Sélection de souches de *S. aureus* multirésistantes

Après ensemencement et incubation pendant 24 h à 37°C sur gélose Chapman, 2 colonies identiques de chaque culture de *S. aureus* (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 et S8) sont utilisées pour préparer des suspensions bactériennes dans 5 ml d'eau physiologique (10^8 UFC/ml à l'échelle de 0.5 Mc Farland). Après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, une dilution à 10^{-1} est effectuée, pour avoir 10^7 UFC/ml. Selon CA-SFM, (2006) :

- Un écouvillon stérile est trempé dans chaque suspension bactérienne à 10^7 UFC/ml.
- L'écouvillon est essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Sur une boîte de Petri présentant 4 mm d'épaisseur de gélose Mueller Hinton, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface de la gélose de haut en bas et en stries serrées.
- L'opération est répétée 2 fois en tournant la boîte à chaque fois.

Matériel et méthodes

- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Les disques d'antibiotiques (tableau I) sont déposés sur la gélose Mueller Hinton (annexe I) incubée à 37°C pendant 24. Après incubation, on mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques.

Tableau I. Liste des antibiotiques testés, (UI. Unité Internationale).

Antibiotique	Famille	Charge du disque (µg)
Pénicilline G (P)	β-lactamines	10 UI
Amoxicilline (AML)		2
Oxacilline (OX)		5
Vancomycine (VA)	Glycopeptides	30
Tetracycline (TE)	Tetracyclines	30
Streptomycine (S)	Aminosides	10
Gentamycine (GM)		15
Pristinamycine (PT)	Streptogramines	15
Ciprofloxacine (CIP)	Fluoroquinolones	5
Céphalosporines (CS)	Céphalosporines	30

5. Etude de l'activité antibactérienne d'une souche de *L. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* multirésistantes

5.1. Origine de la souche de *L. lactis*

La souche de *L. lactis* utilisée dans cette étude a été isolée à partir de lait cru de vache. Elle a été identifiée génotypiquement par séquençage de l'ADNr 16S par Dr Ait meddour en 2012. 4 colonies de *L. lactis* donnent après repiquage dans 9 ml de bouillon MRS et incubation à 30°C une charge de 10⁸ UFC/ml.

5.2. Test des spots

L'activité antibactérienne d'une souche de *L. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* multirésistantes est mise en évidence par le test des spots. Après avoir rempli les boîtes de Pétri avec de la gélose MRS (annexe I), 10 µl de la suspension bactérienne de la souche lactique (10⁸ UFC/ml) sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées près du bec bunsen pendant 30 min puis incubées à 30°C pendant 18 h (Fernández et al., 2007). Après la période d'incubation, les boîtes sont recouvertes de 20 ml d'une gélose nutritive (GN) (annexe I) en surfusion ensemencées avec 1 ml de

Matériel et méthodes

la culture fraîche des souches cibles (10^6 UFC/ml à l'échelle de Mc Farland), puis incubées à 37°C pendant 24 h. Au terme de la période d'incubation, la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des spots est notée.

5.3. Mise en évidence des métabolites antibactériens

5.3.1. Test des puits

Afin de tester l'activité antibactérienne du surnageant de culture de la souche lactique (*L. lactis*) à l'égard de *S. aureus*, une culture de *L. lactis* (10^8 UFC/ml) préparée dans du bouillon MRS (annexe I) est centrifugée deux fois à $8000g/20$ min à 4°C . Le surnageant récupéré est stérilisé par filtration sur une membrane d'acétate de cellulose ($0,45\ \mu\text{m}$, Millipore, USA) après avoir mesuré le pH (Ghrai et al., 2008). Par la suite le surnageant est testé pour son activité comme décrit par Barefoot et Kaenhammer, (1983).

Chaque suspension de *S. aureus* multirésistant (10^6 UFC/ml) est ensemencée par écouvillon sur 20 ml de GN (solide). Après ensemencement, des puits de 6 mm de diamètre et de 5 mm de profondeur sont creusés dans la gélose à l'aide d'une baguette en verre stérile. Le fond de chaque puits est scellé avec une goutte de GN. Les puits sont par la suite remplis avec $100\ \mu\text{l}$ du surnageant brute/natif de la souche lactique et laissé diffuser pendant 2 h à 4°C . Après cette période, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h (Schillinger et Lucke, 1989). L'activité antibactérienne est révélée par la présence de zones d'inhibition autour des puits (Fig. 3).

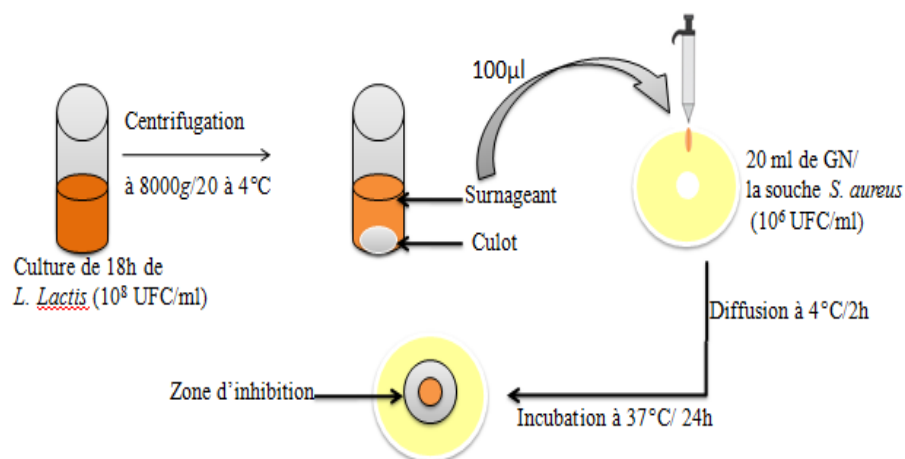


Fig. 3. Schéma illustrant les étapes de la réalisation du test des puits

5.3.2. Test des puits après désorption

Afin de tester l'éventuelle adsorption des substances actives aux parois des bactéries productrices, une désorption des substances antibactériennes est réalisée par la méthode de **Yang et al., (1992)**. Le culot de la souche lactique obtenu après une double centrifugation à 8000g/20 min à 4°C est resuspendu dans une solution de HCl (3N, pH 2) et entreposé pendant 12 h à 4°C. Au terme de la période d'entreposage, une centrifugation (8000 g/20 min à 4°C) est réalisée. Le surnageant récupéré est neutralisé avec du NaOH (2 N) stérile puis testé pour son activité antibactérienne vis-à-vis des souches cibles comme décrit en 5.1.

5.3.3. Test des puits après concentration du surnageant

Etant donné que l'activité du surnageant pourrait être réduite par un effet de dilution, une concentration est réalisée. 100 ml de surnageant obtenu après une double centrifugation à 8000 g/20 min à 4°C sont concentrés 10 fois sous vide à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor R-300, BUCHI, Suisse) puis filtrés sur une membrane d'acétate de cellulose (0,45 µm, Millipore, USA) et testés comme décrit en 5.1 en utilisant le surnageant concentré à pH natif.

Résultats et Discussion

1. Isolement et purification des souches de *S. aureus*

Après une incubation à 37°C/24 h, les quatre tubes contenant le milieu Giolitti et Cantoni additionnés de tellurite de potassium ensemencés par le lait, ont donné un noircissement. L'apparition d'un noircissement indique que ces bactéries peuvent être des souches de *S. aureus*, qui est due à la réduction du tellurite en tellure métallique. L'isolement des souches de *S. aureus* a été effectué sur gélose Chapman, après une incubation à 37°C/24 h des colonies jaunes ont été apparues.

2. Identification

2.1. Etude macroscopique

Les colonies ont été apparues de couleur jaune doré, de forme bombées avec des bords réguliers, luisantes avec un diamètre de 1 à 3 mm et avec un virage du milieu au jaune. Le virage de couleur du milieu Chapman en jaune due à la capacité des souches de fermenter le mannitol.

2.2. Etude microscopique

L'aspect microscopique des cellules après une coloration de Gram a montré des formes cocci, à Gram positif (couleur violette), arrangées en diplocoque, en chaînette courtes et en grappe de raisin (mode de regroupement spécifique de *S. aureus*) (Fig. 4).

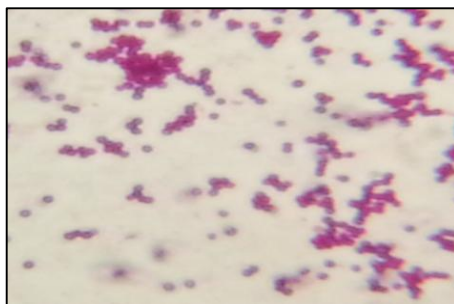


Fig.4. Aspect microscopique des souches de *S. aureus* sous microscope optique après une coloration de Gram (x100)

2.3. Test de la catalase

Une effervescence a été observée pour toutes les souches isolées, cette dernière est issue de la dégradation de H₂O₂ et du dégagement de l'oxygène, ce résultat indique que les souches sont catalase positive.

2.4. Test de la coagulase

Les résultats de ce test ont montré la formation d'un coagulum dans chaque tube, au bout des deux premières heures d'incubation. La formation du coagulum est due à la capacité de *S. aureus* de

Résultats et discussion

produire une coagulase, qui se fixe à l'extrémité N-terminale de la prothrombine, ce qui modifie la conformation de ce dernier et lui permet d'acquérir une activité protéolytique, convertissant le fibrinogène soluble en fibrine insoluble permettant la coagulation du plasma (Vincenot et al., 2008).

« En se basant sur les tests d'identification cités en haut, un total de 8 souches (S1-S8) appartenant à l'espèce *S. aureus* a été obtenu »

3. Sélection des souches de *S. aureus* multirésistantes

Pour pouvoir sélectionner les souches de *S. aureus* multirésistantes, des antibiogrammes de ces dernières ont été effectués vis-à-vis de dix antibiotiques de différentes familles. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau II.

Tableau II. Résultats des antibiogrammes des souches de *S. aureus*

Souches ATBs	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8	
Pénicilline G	12	R	3	R	16	R	22	R	8	R	30	S	8	R	8	R
Amoxicilline	28	-	9	-	26	-	26	-	12	-	34	-	12	-	12	-
Oxacilline	20	S	20	S	19	R	20	S	25	S	28	S	24	S	30	S
Vancomycine	11	R	12	R	10	R	10	R	14	R	12	R	14	R	14	R
Tétracycline	22	S	22	S	20	S	18	S	10	R	24	S	8	R	9	R
Streptomycine	8	R	10	R	8	R	6	R	10	R	10	R	10	R	11	R
Gentamycine	20	S	19	R	20	S	19	R	23	S	22	S	23	S	22	S
Pristinamycine	20	I	20	I	19	I	19	I	22	I	21	I	23	I	23	I
Ciprofloxacine	19	I	19	I	20	I	20	I	24	S	23	S	25	S	21	I
Céphalosporines	24	-	25	-	20	-	20	-	29	-	27	-	30	-	25	-

ATBs : antibiotiques, **S** : sensible, **R** : résistant et **I** : intermédiaire.

Selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CA-SFM, (2006) (Annexe II), les souches de *S. aureus* isolées à partir de lait cru de vaches saines (S1, S2, S3 et S4) et de vaches mammitesuses (S5, S6, S7, et S8) sont multirésistantes. En effet, 7 souches de *S. aureus* isolées (S1, S2, S3, S4, S5, S7 et S8) ont été résistantes à la pénicilline G, 8 souches sont résistantes à la streptomycine et à la vancomycine et 8 souches ont présenté une résistance intermédiaire à la pristinamycine (Fig. 5).

Dans une étude réalisée par André et al., (2008), ces auteurs ont trouvé que 70,8 % des souches *S. aureus* isolées de lait cru de vaches saines étaient résistantes à la pénicilline G et 33,3 % étaient résistantes à la tétracycline. Jamali et al., (2015), ont montré que les souches de *S. aureus* isolées de lait cru de vache, de lait de brebis, et de fromage sont multirésistantes. 1,9 % des souches sont

Résultats et discussion

résistantes à la gentamycine, 13% sont résistantes à l'oxacilline, 44% sont résistantes à la pénicilline ; 5,6% sont résistantes à la streptomycine et 56,6% sont résistantes à la tétracycline.

Coelho et al., (2009), ont trouvé que sur 21 souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches atteintes de mammites, 47% étaient résistantes à la pénicilline G.

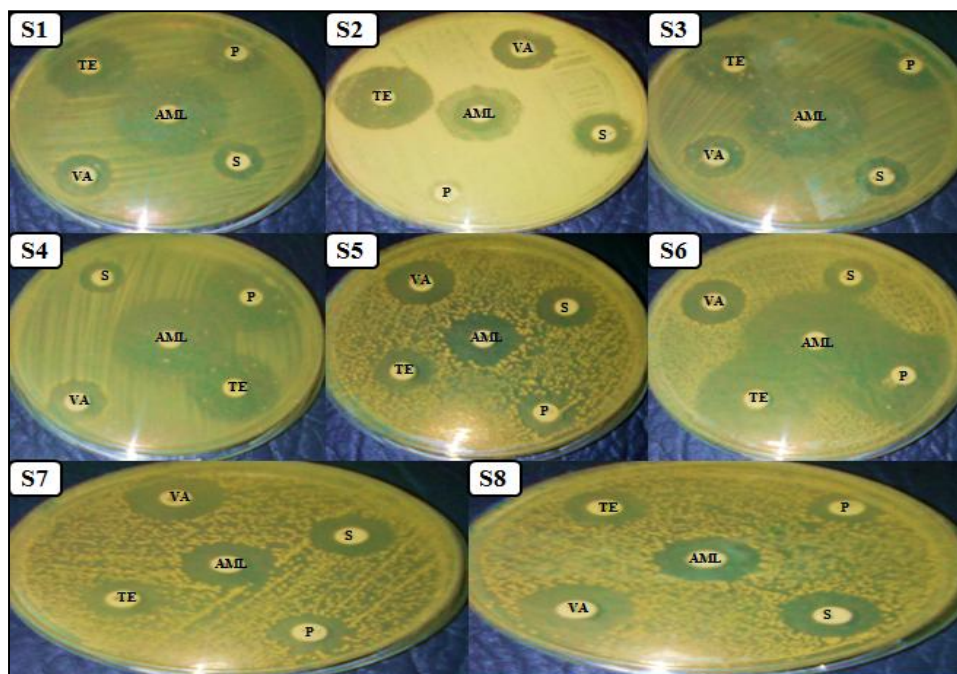


Fig.5. AntibioGrammes des souches de *S. aureus* vis-à-vis de 5 antibiotiques (TE, P, AML, S et VA).

L'utilisation d'agents antimicrobiens dans les fermes laitières est une préoccupation majeure dans l'émergence de bactéries pathogènes zoonotiques résistantes (**Mohammed et al., 2018**). Dans une étude rapportée par **Nickerson, (2008)**, il a été démontré que même avec un traitement, seulement 85,9% des infections intra-mammaires sont traitées chez les chèvres et chez les vaches, le taux de guérison était inférieure. Cette persistance peut être due aux souches résistantes aux antibiotiques, ou encore à la formation de biofilms par les souches de *S. aureus*, ce qui les rend moins sensibles aux antibiotiques (**Melchior et al., 2006**). De même, **Goetz et al., (2016)**, ont montré dans leur étude que la formation de biofilm par *S. aureus* est associée à la persistance des infections intra-mammaires et également à la perte de sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.

Les bêta-lactamines sont très largement utilisées pour le traitement des mammites bovines, ce qui a conduit à l'apparition de résistance chez les souches de *S. aureus* responsables de mammites.

La résistance de *S. aureus* aux glycopeptides se développe de plus en plus, car ces souches accumulent plusieurs facteurs impliqués dans le mécanisme de résistance à cette famille d'antibiotiques (**Marchese et al., 2000**).

Résultats et discussion

Hiramatsu *et al.*, (1997) et Hiramatsu, (2001), ont observé que l'augmentation de l'utilisation de la vancomycine conduit à l'apparition des souches de *S. aureus* résistantes à cette antibiotique. Ces résultats pourraient expliquer certains échecs cliniques éprouvés avec la vancomycine dans le traitement des infections à *S. aureus* lors du traitement des mammites bovines (Marchese *et al.*, 2000 ; Leclercq et Cattoir, 2012 ; Derib *et al.*, 2017). Cette sensibilité diminuée de *S. aureus* aux glycopeptides pose un réel problème (Hiramatsu *et al.*, 1997).

4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *L. lactis* à l'égard de *S. aureus*

4.1. Test des spots

La souche de bactérie lactique *L. lactis* utilisée pour l'antagonisme direct a présenté une activité antibactérienne importante à l'égard des souches de *S. aureus* (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 et S8). Le résultat du test des pots est présenté dans le tableau III.

Tableau III. Diamètres des zones d'inhibition enregistrés par le test de spots

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Diamètres (mm)	17	18	10	20	14	16	8	15

Quelques zones d'inhibition ont été observées à l'égard des souches S1, S2 et S4 avec respectivement, 17,18 et 20 mm de diamètre. Les résultats sont illustrés sur la figure 6.

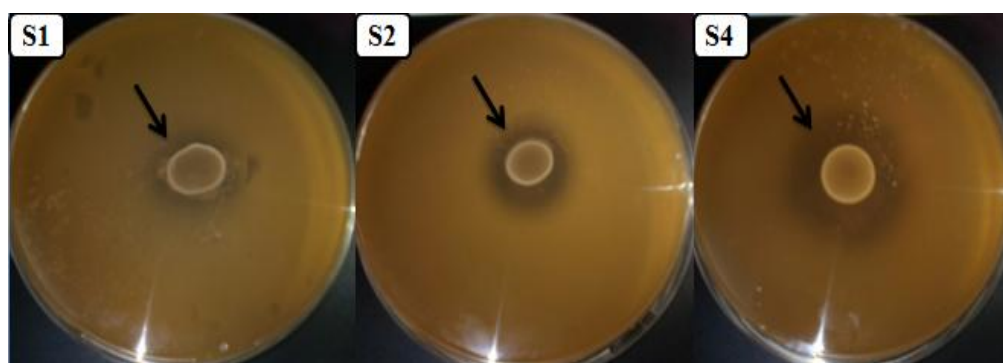


Fig.6. Résultat du test de spots de *L. lactis* vis-à-vis des souches de *S. aureus*

Selon plusieurs auteurs, l'effet inhibiteur pourrait être attribué à la compétition nutritionnelle et aux métabolites produits par les bactéries lactiques tels que les acides organiques, essentiellement l'acide lactique (El Moualdi *et al.*, 2008).

Résultats et discussion

L'antagonisme de *L. lactis* envers les souches de *S. aureus* est dû probablement, à la synthèse des substances qui ont un effet anti-staphylococcique. Ces métabolites peuvent être des acides organiques, ou encore des composés protéiques assimilables aux bactériocines (Ito et al., 2003).

D'après El Moualdi et al., (2008), l'activité antibactérienne des lactocoques est due à une substance extracellulaire, de nature peptidique et thermostable ce qui reprend aux caractéristiques des bactériocines.

4.2. Mise en évidence des métabolites antibactériens

4.2.1. Test des puits

Le test des puits en utilisant le surnageant de culture brut (pH 4,4) n'a montré aucune zone d'inhibition des souches cibles. Des résultats similaires ont été montrés 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.

L'absence de l'effet inhibiteur pourra se traduire par l'absence de métabolites inhibiteurs ou à leur faible production sous les conditions de culture utilisées ou encore à l'adsorption de ces derniers à la surface des cellules productrices dans le cas de substances assimilées aux bactériocines (Mami et al., 2008).

4.2.2. Test des puits après désorption

Afin de vérifier l'hypothèse d'adsorption des métabolites à la surface des cellules productrices, une désorption en milieu acide tel que décrit par Yang et al. (1992) a été réalisée. Ce dernier a donné un résultat positif de l'activité antibactérienne de *L. lactis* envers les souches cibles. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau IV. Quelques exemples de zones d'inhibition sont illustrés sur la figure 7.

Tableau IV. Diamètres des zones d'inhibition enregistrés par le test des puits après désorption

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Diamètres (mm)	22	20	22	22	24	24	24	22

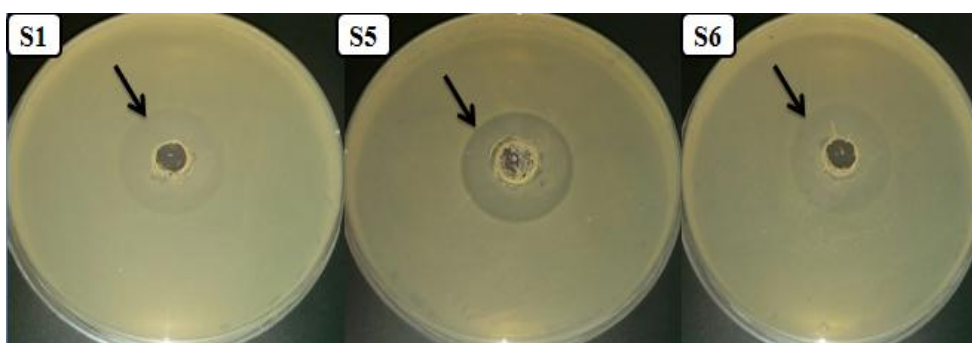


Fig.7. Résultat du test des puits après désorption des substances antibactériennes de *L. lactis*

Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus, des substances antibactériennes peuvent être synthétisées et restées attachées à la paroi des bactéries productrices. **Elmoualdi et al., (2008)**, ont montré dans leur étude que le surnageant de *L. lactis* après désorption possédait un effet bactéricide vis-à-vis de la souche *S. aureus* ATCC25923 (**El Moualdi et al., 2008**).

Ghalfi et al., (2006), ont trouvé que le surnageant de *Lb. curvatus* CWBI-B28 et de *L. lactis* après désorption peuvent inactiver la croissance de *L. monocytogenes*, ce qui suggère que le surnageant contenait des substances inhibitrices nommer bactériocines.

4.2.3. Test des puits après concentration du surnageant

Afin de vérifier l'hypothèse de l'effet de dilution des substances antibactériennes éventuellement présentes dans le surnageant de culture de la souche lactique, une concentration (10x) de ce dernier a été réalisée. D'après le résultat obtenu, le surnageant concentré (pH 4,1) a montré un effet antibactérien à l'égard des 8 souches de *S. aureus*. Les diamètres des zones d'inhibition sont présentés dans le tableau V.

Tableau V. Diamètres des zones d'inhibition enregistrés par le test des puits après concentration du surnageant

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Diamètres (mm)	4	5	5	6	7	6	16	12

Le surnageant de culture de *L. lactis* concentré a présenté un bon pouvoir antibactérien, ce dernier a été révélé par des diamètres de zones d'inhibition allant de 4 à 16 mm (Fig. 8). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Mami et al., (2010)**, qui ont démontré que l'activité antibactérienne augmente avec l'augmentation de la concentration du surnageant brut de la culture de *Lb. plantarum* envers *S. aureus*. **Kivanc, (1990)**, a observé des degrés variables d'inhibition de divers microorganismes pathogènes d'origine alimentaire par des surnageants concentrés de culture de bactéries lactiques.

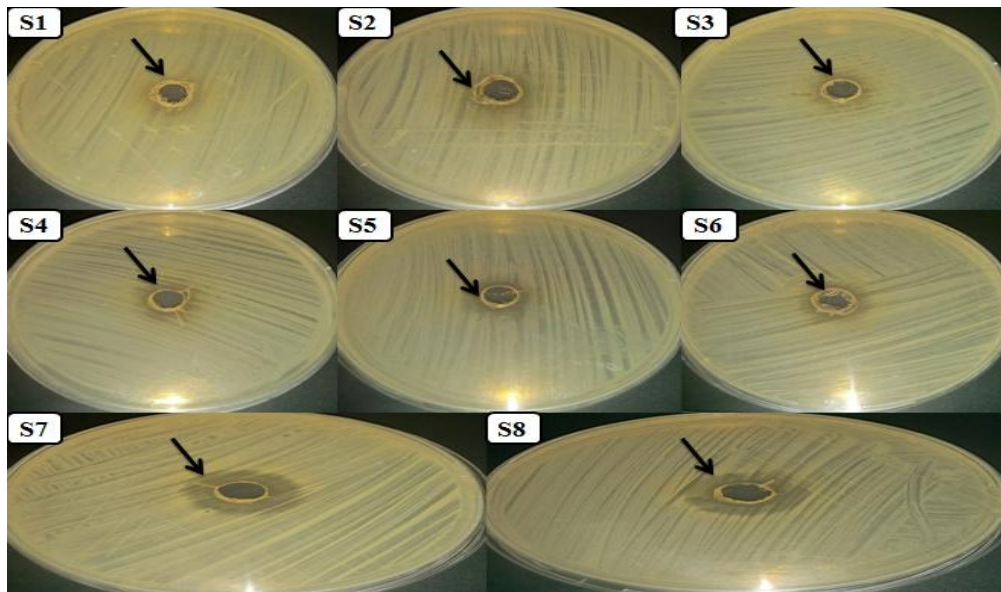


Fig.8. Résultat du test des puits après concentration (10x) du surnageant de *L. lactis*

L'effet inhibiteur des surnageants pourrait être attribué à la production d'acides organiques induisant l'abaissement du pH et créant un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes et d'altération (**Tienungoon et al., 2000**).

Plusieurs auteurs ont démontré l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes et/ ou d'altération par les bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* et *Lactococcus*. **Allouche et al., (2010)**, ont démontré que six *Lactobacillus* isolés du lait cru produisent des substances antibactériennes capables d'inhiber la croissance de *S. aureus*, d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*.

D'autre part, **Hwanhlem et al., (2010)**, ont observé que des souches appartenant au genre *Enterococcus*, *Leuconostoc sp* et *Lactococcus* possédaient une activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli* et de *S. aureus*.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a été consacrée à l'étude de l'activité antibactérienne d'une souche de bactérie lactique « *L. lactis* » envers des souches de *S. aureus* multirésistantes.

Au préalable, un isolement et une identification de souches de *S. aureus* ont été effectués, à partir de lait cru de vaches mammitesuses et saines. Au total, 8 souches de *S. aureus* ont été isolées.

Après l'isolement, des antibiogrammes ont été réalisés afin de sélectionner celles qui sont résistantes aux antibiotiques. Les résultats ont montré que toutes les souches de *S. aureus* résistent à la vancomycine à la streptomycine, et à la pénicilline G à l'exception de la souche (S6).

En appliquant un test direct et rapide de détection de l'activité antibactérienne (test des spots) en ciblant les souches de *S. aureus*, les résultats ont montré que la souche *L. lactis* possède une bonne activité anti-staphylococcique avec des diamètres variant entre 8 mm et 20 mm.

La meilleure zone d'inhibition a été enregistrée envers la souche S4. Par contre la souche S7 est la moins sensible à l'activité de *L. lactis*.

Les résultats obtenus par le test des puits en utilisant le surnageant brute (fractions extracellulaires) ont montré l'absence de zones d'inhibition d'où l'absence de l'activité antibactérienne. Par contre les résultats de ce test après désorption ont montré que la souche *L. lactis* possède une bonne activité antagoniste envers les souches de *S. aureus* multirésistantes avec des diamètres variant entre 20 mm et 24 mm.

Après concentration (10 x) de surnageant de culture, un effet antibactérien à l'égard de toutes les souches de *S. aureus* a été enregistré, la meilleure activité antibactérienne a donné une zone d'inhibition de 12 mm de diamètre envers la souche S8.

Ces résultats plaident en faveur de l'utilisation de *L. lactis* comme, probiotique ou comme 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.

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

- L'étude de l'antagonisme *in vitro* de la souche lactique, *L. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* multirésistantes en milieu liquide : cultures mixtes dans le lait.
- La détermination de l'effet antibactérien à l'égard d'autres espèces bactériennes pathogènes où d'altération pouvant exister ou contaminer le lait.
- La mise en évidence de la nature des substances antibactériennes produites par *L. lactis* leur purification et caractérisation. Ces métabolites pourraient éventuellement être une alternative aux antibiotiques pour traiter les mammites et autres maladies où *S. aureus* multirésistant est impliqué.
- De même, *L. lactis* pourrait être ajouté au lait cru (où *S. aureus* est présent) destiné à la fabrication de fromages du terroir.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

A

- Adams M R. (1999).** Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 68: 171-178.
- Ahmadi M, Rohani S M R, et Ayremlou N. (2010).** Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. *Comparative clinicalpathology*. 19(1): 91-94.
- Al alam D. (2008).** Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales et bronchiques et *Staphylococcus aureus* sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Thèse de Doctorat en Immunologie. Université de Reims (France). 164p.
- Allouche F N, Hella A, Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*. 3: 13-14.
- 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. Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*. 17: 454-461.
- André, M. C. D., Campos, M. R. H., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C., et Serafini, A. B. (2008).** Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control*. 19(2): 200-207.
- Ateba C N, Mbewe M, Moneoang M S, et Bezuidenhout C C. (2010).** Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng Area, North West province, South Africa. *South African Journal of Science*. 106(11-12): 35-40.
- Axelsson L. (1990).** *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. Departement Microbiology; University of Agricultural Sciences. Uppsala (Sweden). 64p.
- ### B
- Baliarda A. (2003).** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*, approches physiologiques et genetiques. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition. Université de Bordeaux (France). 175p.
- Barefoot S F, et Kleanhammer T R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lb. acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1808-1815.

Références bibliographiques

Bartlett J G. (1992). Antibiotic-associated diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*. 15: 573-581.

Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, et Soukri A. (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*. 9(27): 4251-4258.

Bazarre T L, Wu L, et Yuhas J A. (1983). Total and HDL-cholesterol concentrations following yogurt and calcium supplementation. *Nutrition Reports International*. 28: 1225-1232.

Bhunja A K. (2018). Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. 2^{ème} edition Springer Science+Business Media. 182p.

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 (International Office of Epizootics)*. 16(1): 452-471.

Broadbent J R, et Steele J L. (2005). Cheese flavor and the genomics of lactic acid bacteria. *American Society for Microbiology News*. 71(3): 121-128.

Byczkowski J Z et Gessner T. (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*. 20: 569-580.

C

CA-SFM. (2006). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2006. Paris, France: Société Française de Microbiologie. 33-35p.

Cattoir V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie biologie*. 52 (2004): 607-616.

Charlier C, Cretenet M, Even S, et Le Loir Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International journal of food microbiology*. 131(1): 30-39.

Chauvière G, Coconnier M H, Kernéis S, Fourniat J, et Servin A L. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology*. 138: 1689-1696.

Références bibliographiques

Coelho S M O, Reinoso E, Pereira I A, Soares L C, Demo M, Bogni C, et Souza M M S. (2009). Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 29: 369-374.

Crossley K. (2016). Overview of *Staphylococcus aureus* in Medicine. In: Weigelt J. A. MRSA. 2^{ème} Edition . CRC Press. 1-10p.

D

Dayan G H, Mohamed N, Scully I L, Cooper D, Begier E, Eiden J, Jansen K U, Gurtman A, et Anderson A S. (2016). *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert review of vaccines*. 15(11): 1373-1392.

De Buyser M L, Dufour B, Maire M, et Lafarge V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. Review article. *International Journal of Food Microbiology*. 67: 1–17.

Derib B T, Birhanu B T, et Sisay T. (2017). Isolation and Identification of Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Bovine Mastitic Milk in and around Wolaita Sodo, Southern Ethiopia. *Open Access Journal of Veterinary Science & Research*. 2: 1-11.

de Roissart H. (1986). Bactéries lactiques *in* Lait et produits laitiers. T. 3. Vache, brebis et chèvre. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier (Paris). 633p.

De Villiers V. (1995). The effect of lactose maldigestion on the stools of young Tswana children. *Journal of Tropical Pediatrics*. 41: 54-56.

De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, et Schrezenmeir J. (2001). Probiotics-Compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 421-429.

Drouault S, et Corthier G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*. 32(2): 101-117.

Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy M É, Tristan A, et Vandenesch F. (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* -Les points-clés en 2010. *Médecine/Sciences*. 26(11): 943-949.

Références bibliographiques

E

Eklund T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International journal of Food Microbiology*. 1: 179-185.

El Moualdi L, Labioui H, Boushama L, Benzakour A, Ouhsine M, et El Yachioui M. (2008). Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 147: 7-18.

F

FAO/OMS. (2001). The Food and Agriculture Organisation of the United Nations and the World Health Organisation Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO. 3p.

Fernández M, Martínez-Bueno M, Martín M C, Valdivia E, et Maqueda M. (2007). Heterologous exoression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 1350-1361.

G

García P, Martínez B, Rodríguez L, et Rodríguez A. (2010). Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International journal of food microbiology*. 141(3): 151-155.

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

Ghalfi H, Allaoui A, Destain J, Benkerroum N, et Thonart P. (2006). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 C storage. *Journal of food protection*. 69(5): 1066-1071.

Ghraiiri T, Frere J, Berjeaud J M, Manai M. (2008). Purification and characterisation of bacteriocins produced by *En. faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*. 19: 162–169.

Gilliland S E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 87: 175-188.

Références bibliographiques

Goetz C, Dufour S, Archambault M, Malouin F, et Jacques M. (2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière :*Médecine Vétérinaire*. 167(7-8): 215-229.

Gould G W. (1991). Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. Ed. I. Van Nostrand Reinhold (New York). 461-483p.

Guiraud J P. (1998). *Microbiologie Alimentaire*. Edition Dunod (Paris). 652 p.

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

Guiraud J P et Rosec J P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR. Ed. Dunod (France). 298p.

H

Hernandez D, Cardell E, et Zarate 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.

Hickson A, D'Souza A L, Muthu N, Rogers T R, Want S, Rajkumar C, Bulpitt C J. (2007). Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*. 335: 80-83.

Hiramatsu K. (2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *The Lancet infectious diseases*. 1(3): 147-155.

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, et Tenover F C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 40(1): 135-136.

Ho V T T, Lo R, Bansal N, et Turner M S. (2018). Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Control*. 85: 472-483.

Holzappel W H, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, et Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 73(2): 365-373.

Références bibliographiques

Huttunen E, Noro K, et Yang Z. (1995). Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *International Dairy Journal*. 5: 503-513.

Hwanhlem N, Watthanasakphuban N, Riebroy S, Benjakul S, H-Kittikun A, et Maneerat S. (2010). Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *International journal of food science & technology*. 45(3): 594-601.

I

Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H, et Toba T. (2003). The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic foodborne pathogens. *Current Microbiology*. 47: 231–236.

J

Jamali H, Paydar M, Radmehr B, Ismail S, et Dadrasnia A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control*. 54: 383-388.

Jay J M, et Loessner M J. (2005). Staphylococcal gastroenteritis in Modern food microbiology. Ed. VII. Springer (New York). 790p.

Joo H S, et Otto M. (2015). Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1848(11): 3055-3061.

K

Kabara J J. (1993). Medium-chain fatty acids and esters. In Antimicrobials in Foods. Ed. II. Marcel Dekker Inc (New York). 307-342p.

Kashket E R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 46: 233-244.

Khemariya P, Singh S, Nath G, et Gulati A K. (2017). Probiotic *Lactococcus lactis*: A Review. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 5(6): 556-562.

Kivanac M. (1990). Antagonistic action of lactic cultures towards spoilage and pathogenic microorganisms in food. *Die Nahrung*. 34: 273-277.

Klaenhammer T R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70: 337-349.

Références bibliographiques

Klaenhammer T R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies microbiology reviews*. 12: 39-86.

Klein G, Pack A, Bonaparte C, et Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 103-125.

Kong S et Davison A J. (1980). The role of interactions between O₂, H₂O₂, .OH, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 204: 18-29.

L

Lamprell H. (2003). Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. Université de Bourgogne (France). 79p.

Laroute V, Tormo H, Couderc C, Mercier-Bonin M, Le Bourgeois P, Cocaïgn-Bousquet M, et Daveran-Mingot M L. (2017). From genome to phenotype: an integrative approach to evaluate the biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms*. 5: 1-17.

Leclercq R, et Cattoir V. (2012). Bactéries à Gram positif et glycopeptides. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2012(445): 41-46.

Lecornet E. (2007). Prévenir la transmission du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline lors de la prise en charge du pied diabétique. Thèse de Doctorat en Médecine. Université de René Descartes (France). 95p.

Leyral G et Vierling E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaire. Wolters Kluwer France. 287p.

Liong M T, et Shah N P. (2005). Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Research International*. 38: 135-142.

Ludwig W, Schleifer K H, et Whiman W B. (2009). Ordre II: Lactobacillales. In: De Vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg N R, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K H, et Whitman W B. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* .3. 2^{ème} Edition. Springer Dordrecht Heidelberg London (New York). 5, 464p.

Références bibliographiques

M

Mami A, Henni J E, Kihal M. (2008). Antibacterial activity of *Lactobacillus* isolated from Algerian raw goat's milk against *S. aureus*. *World Journal of Dairy and Food Science*. 3: 39-49.

Mami A, Kihal M, Hamedi A R , Henni J E , et Kerfouf A. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *Les technologies de laboratoire*. 5(21): 26-33.

Marteau P, Flourie B, Pochart P, Chastang C, Desjeux J F, et Rambaud J C. (1990). Effect of the microbial lactase (*EC 3.2.1.23*) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase-deficient humans. *British Journal of Nutrition*. 64: 71-79.

Matthias A E, et Rudi F V. (2005). Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. A review. *Trends in Food Science and Technology*. 16: 31-42.

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

Mesaros N, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R, et Tulkens P M. (2005). L'efflux des antibiotiques : un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain médical*. 124(8): 308-320.

Michel V, Hauwuy A, Chamba J F. (2001). Raw cow milk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Lait*. 81: 575-592.

Miyoshi A, Jamet E, Commissaire J, Renault P, Langella P, et Azevedo V. (2004). A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 239(2): 205-212.

Mofredj A, Bahloul H, et Chanut C. (2007). *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste. *Médecine et maladies infectieuses*. 37: 200-207.

Mohammed J, Ziwa M H, Hounmanou Y M G, Kisanga A, et Tuntufye H. N. (2018). Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk in Tanzania. *International journal of microbiology*. 2018: 1-6.

Références bibliographiques

Mokoena M P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*. 22: 1-12.

Motlagh A M, Johson M C, et Ray B. (1991). Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *Journal of Food Protection*. 873-878.

Munita J M, et Arias C A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*. 4(2): 1-37.

N

Nickerson S C. (2008). Control of heifer mastitis: Antimicrobial treatment—An overview. *Veterinary Microbiology*. 134: 128-135.

Nigutova K, Morovsky M, Pristas P, Teather R M, Holo H, et Javorsky P. (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 563-569.

O

Oscariz J C et Pisabarro A G. (2001). Classification and modes of action of membrane active bacteriocins produced by Gram-positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*. 4: 13-19.

Otero M C et Nader-Macías M E. (2005). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂ producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science*. 96: 35–46.

Ouelhadj A, Salem L A, et Djenane D. (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pelargonium x asperum* et son potentiel synergique avec la nisine. *Phytothérapie*. 1-2.

P

Parada J L, Caron C R, Medeiros A B P, et Soccol C R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(3): 521-542.

Pasqualatto D et Abbinante F. (1998). Massive toxic exposure to contaminated food with *S. aureus*. *Toxicology letters*. 95(1): 158.

Références bibliographiques

Peacock S J, et Paterson G K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual review of biochemistry*. 84: 577-601.

Pellerin J L, Gautier M, et Le Loir Y. (2009). Identification de l'espèce au sein du genre. In : Le Loir Y et Gautier M. Monographie de microbiologie: *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. 3,4p.

Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, et Teuber M. (1997). Antibiotic resistance spread in food. *Nature*. 389(6653). 801-802.

Piard J C et Desmazeaud M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolisme end-products. *Lait*. 71: 113-142.

Q

Quincampoix J C, et Mainardi J L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*. 10(3): 267-275.

R

Rao D R, et Reddy J C. (1984). Effect of lactic fermentation on milk lipids. *Journal of Food Science*. 49: 784-750.

Reddy G V, Shahani K M, Friend B A, et Chandan R C. (1983). Natural antibiotic acitivity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* III: produciton and partial purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*. *Cultured Dairy Products Journal*. 18: 15-19.

Ringø E, et Gatesoupe F J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*. 160: 177-203.

S

Saranraj P, Naidu M A, et Sivasakthivelan P. (2013). Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: a review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*. 4(6): 1124 - 1133.

Savadogo A, OuattaraCheik A T, BassoleImael H N, et Traore S A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*. 5(9): 678-683.

Schillinger U, et Lücke F.K. (1990). Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischwirtschaft*. 70: 1296-1299.

Références bibliographiques

Schneitz C, Nuotio L, Lounatma K. (1993). Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *Journal of Applied Bacteriology*.74: 290-294.

Schleifer K H. (1983). Staphylococci and staphylococcal infection.Vol. 2. Ed. Academic Press (Londres). 476p.

Schleifer K H, et Bell J B. (2009). Genus I Staphylococcus. In: De Vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg N R, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K H, et Whitman W B; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 3. 2^{ème}. Springer Dordrecht Heidelberg London (New York). 392-421p.

Silva M, Jacobus N V, Deneke C, et Gorbach S L. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31: 1231-1233.

Soomro A, Masud T, et Anward K. (2002). Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in food preservation and human health – A review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1: 20-24.

Steinkraus K H. (1983). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Ed. Marcel Dekker (New York). 671p.

Sutra L, Federighi M, et Jouve J L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. Polytechnica (Paris). 308p.

T

Talon R, Labadie J, et Larpent J P. (1980). Characterization of the inhibitory power of *Lactobacillus* of meat origin. *Zentralblatt Bakteriologie*. 170: 133-142.

Tankovic J, Aubry-Damon H, et Leclercq R. (1997). Résistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Médecine et maladies infectieuses*. 27: 207-216.

Thaker H C, Brahmhatt M N, et Nayak J B. (2013). Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat. *Veterinary World*. 6(1): 10-13.

Tidona F, Meucci A, Povo M, Pelizzola V, Zago M, Contarini G, et Giraffa G. (2018). Applicability of *Lactococcus hircilactis* and *Lactococcus laudensis* as dairy cultures. *International journal of food microbiology*. 271: 1-7.

Références bibliographiques

Tienungoon S, Ratkowsky D A, Mcmeekin T A, Ross T. (2000). Growth limits of *L. monocytogenes* as function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4979-4987.

V

Vesterlund S, Karp M, Salminen S, et Ouwehand A.C. (2006). *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology*. 152: 1819–1826.

Vincenot F, Saleh M, et Prévost G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*. 407: 61-69.

Vitale M, Gaglio S, Galluzzo P, Cascone G, Piraino C, Di Marco Lo Presti V, et Alduina R. (2017). Antibiotic Resistance Profiling, Analysis of Virulence Aspects and Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolated in Sicily, Italy. *Foodborne pathogens and disease*. 15(3): 177-185.

W

Wassie M, et Wassie T. (2016). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 3(8): 44- 49.

Y

Yang R, Johnson M, Ray B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3355-3359.

Z

Zhang M, Hang X, Fan X, Li D, et Yang H. (2008). Characterization and selection of *Lactobacillus* strains for their effect on bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 7-14.

Zhang S, et Stewart G C. (2001). Staphylococcal Enterotoxins in *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Ed. Springer (New York). 342p.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

Annexes

Composition des milieux de culture (Selon les fournisseurs)

Tableau I. Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Composant	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammoniacale	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Eau distillée	Qsp 1L

pH 6,5

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar.

Tableau II. Bouillon coeur – cervelle (BHI)

Composant	g/l
Extrait de coeur – cervelle	17,5
Peptone pancréatique de gélatine	20
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2,5
Glucose	2
Eau distillée	Qsp 1L

pH 7,4

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar.

Tableau III. Bouillon Muller-Hinton

Composant	g/l
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Fécule	1,5
Extrait de bœuf	3
Eau distillée	Qsp 1L

pH 7

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar.

Annexe I

Tableau IV. Gélose Chapman

Composant	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	1
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
Chlorure de sodium	75
Eau distillée	Qsp 1L
Agar	15

pH 7,5

Tableau V. Bouillon Giolitti cantoni

Composant	g/l
Tryptone	10,0
Extrait de viande de boeuf	5,0
Extrait de levure	5,0
Chlorure de lithium	5,0
Mannitol	20,0
Chlorure de sodium	5,0
Glycine	1,2
Pyruvate de sodium	3,0
Eau distillée	1000 ml

pH 6,9

Tableau VI. Bouillon nutritif (BN)

Composant	g/l
Peptone	10
NaCl	5
Extrait de levures	5
Eau distillée	Qsp 1L

pH 7,2

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar.

Annexe II

Tableau: Diamètres critiques pour *Staphylococcus spp.* selon CA-SFM, (2006)

Antibiotique	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
		S	R
Pénicilline G	6 µg (10 UI)	≥29	< 29
Oxacilline	5 µg	≥20	< 20
Streptomycine	10 UI	≥15	< 13
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≥20	< 20
Pristinamycine	15 µg	≥22	< 19
Vancomycine	30 µg	≥17	-
Tétracycline	30 UI	≥19	<17
Ciprofloxacine	5 µg	≥22	< 19

Présenté par : Boudjelal Aya & Brahimi Soumia

Président : Dr Bekka F

Examineur : M^{me} Roula S

Encadreur : Dr Ait meddour A

Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne de *Lactococcus lactis* à l'égard des souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes isolées de lait cru de vaches

Résumé

Au cours de cette étude, 8 souches de *S. aureus* ont été isolées à partir de lait cru de vaches saines/mammiteuses. Les résultats des antibiogrammes ont montré que les souches de *S. aureus* isolées sont multirésistantes, 75% des souches ont la capacité de résister à 4 antibiotiques différents, 12,5% ont résisté à 3 antibiotiques et 12,5% ont résisté à 2 antibiotiques. Le pouvoir antibactérien de *L. lactis* à l'égard des souches de *S. aureus* multirésistantes a été mis en évidence par le test de spots et le test de diffusion en puits. Ces derniers ont montré que *L. lactis* est douée d'une bonne activité antagoniste vis-à-vis des souches cibles et cela par l'apparition des zones d'inhibition tout autour des spots et des puits réalisés.

Mots clés : *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, activité antibactérienne, lait cru de vache.

Abstract

In this study, 8 strains of *S. aureus* were isolated from raw milk from healthy / mammalian cows. Antibiogram results showed that isolated *S. aureus* strains are multidrug resistant, 75% of strains have the ability to resist 4 different antibiotics, 12.5% resisted 3 antibiotics and 12.5% resisted 2 antibiotics. The antibacterial activity of *L. lactis* against multidrug-resistant *S. aureus* strains was demonstrated by the spot test and the well diffusion test. These tests showed that *L. lactis* is endowed with a good antagonistic activity against the target strains and this by the appearance of the zones of inhibition all around the spots and wells carried out.

Key words: *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, antibacterial activity, raw cow milk.

الملخص

في هذه الدراسة، تم عزل 8 سلالات من المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* من الحليب الخام لأبقار سليمة/مريضة. ولقد أظهرت نتائج اختبار المضادات الحيوية أن سلالات المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* المعزولة متعددة المقاومة، 75% من السلالات لديها القدرة على مقاومة 4 مضادات حيوية مختلفة، 12.5% قاومت 3 مضادات حيوية و 12.5% قاومت مضادين حيويين. يتم اختبار النشاط المضاد للجراثيم لـ *L. lactis* ضد سلالات المكورات العنقودية الذهبية المتعددة المقاومة بواسطة اختبار البقعة واختبار البئر. أظهرت الأخيرة أن *L. lactis* يتمتع بنشاط مضاد للجراثيم جيد ضد السلالات المستهدفة وذلك من خلال ظهور مناطق تثبيط حول البقع والأبار المنجزة.

الكلمات المفتاحية: *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, النشاط المضاد للبكتيريا, حليب البقر الخام.