

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de SAAD DAHLEB -BLIDA 1-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine S.N.V
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie

Thème

**Profil de résistance et activité antimicrobienne des
ferments lactiques isolés à partir du lait de vache.**

Présenté par :

- Mlle AIT HATRIT Iness.
- Mlle FEKIR Nesrine.

La date de soutenance : 09-07-2023.

Devant le jury composé de :

- | | | |
|-------------------------|-----------|----------------------|
| ● Mme BENHOUNA.I | MCB/USDB1 | Présidente. |
| ● Mme MOHAMED MAHMOUD.F | MCA/USDB1 | Examinatrice. |
| ● Mme BOUDJEMA.N | MCA/USDB1 | Promotrice. |

Année universitaire : 2022-2023

Remerciement

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à **Dieu** le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné le courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.

On tient à remercier tout particulièrement notre promotrice **Mme BOUDJEMA Nouara** pour sa patience, sa disponibilité et surtout des judicieux conseils qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance aux membres de jury : **Mme BENHOUNA** (La présidente) et **Mme MOHAMED MAHMOUD** (L'examinatrice) de nous avoir honorés de leur présence et d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance de ce mémoire.

Nos remerciements vont également au responsable du laboratoire d'hygiène de Blida : **Mr TEFFAHI Djamel** pour sa gentillesse, sa générosité et son soutien inestimable tout au long de notre stage.

Nos plus vifs remerciements s'adressent aussi au doctorant : **Mr HAMMADECHE Mohamed Amine** pour sa généreuse disponibilité et pour sa grande professionnalité. Il a su mettre à notre disposition ses connaissances dans le domaine pour nous permettre d'avancer dans notre recherche. Nous avons énormément appris.

Enfin, on tient à exprimer vivement nos remerciements avec une profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation car un projet ne peut pas être le fruit d'une seule personne.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

- A mes très **chers parents** pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation et mon instruction. Je les remercie pour leur tendresse, leur générosité et leur compréhension.
- A mes chers frères **Riadh** et **Wassim** qui m'ont chaleureusement encouragés. Que le bon Dieu les protège.
- A mes grands-parents, mes tantes et mes oncles pour leur soutien moral et leurs prières.
- A mon binôme, ma chère copine **Nesrine**, qui m'a aidée à réaliser ce travail.
- A mes amies proches : **Raounek, Marwa, Hala , Lyna** et **Hadil** qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite beaucoup de succès et de bonheur.
- A mes camarades au laboratoire d'hygiène : **Sarah, Meriem, Ibtissem** et **Imène**.
- A tous les professeurs qui ont contribué à ma formation grâce à leurs conseils précieux.
- Et enfin à toute la **promotion Microbiologie** de l'année scolaire : 2022/2023.

Ait Hatrit Iness

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

À ma très **chère mère**, tu as toujours été pour moi un exemple de la mère respectueuse, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer la femme que tu es. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployé pour mon éducation et ma formation.

À mon **cher père**, aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour ton soutien et encouragements. Je te dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que tu m'offre quotidiennement. Que Dieu le tout Puissant te garde et te procure santé et bonheur.

À ma chère sœur **ASMAA** et à mon frère **Mehdi Ramzi**, pour leurs soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études. Qui m'ont entouré d'amour, d'affection et qui font tout pour ma réussite, que dieu les garde.

Une dédicace spéciale à la personne qui m'a accompagné pendant mes moments de crise et de joie, ma grand-mère, ma deuxième mère pour ton écoute, ta présence et tes nombreux encouragements ma deuxième mère pour moi **MAMI** je vous aime.

À ceux qui m'ont beaucoup aidé et supporté dans les moments difficiles, qui m'ont soutenu et épaulé pour que je puisse atteindre mes objectifs.

J'ai également une tendre pensée pour toute **ma famille**, mes grands-parents, mes chères tantes et mes cousines.

À ma partenaire de mémoire, ma chère binôme **INESS**, mon amie, pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension. Cette année fut riche en émotions et je tiens à te remercier pour ton soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous et qui a toujours été là pour moi à m'écouter et supporter mes crises durant notre expérience c'est grâce à sa patience qu'on est arrivé là.

Fekir Nesrine

Liste des figures :

Figure 1 : Bactéries lactiques sous forme de bacilles (A), coques (B), coccobacilles (C).

Figure 2 : Galerie API 20E.

Figure 3 : Protocole d'isolement des bactéries lactiques.

Figure 4 : Réalisation de l'activité antimicrobienne par la méthode de spots.

Figure 5 : Aspect macroscopique des colonies d'une souche lactique (LVT S13) isolée sur milieu M17.

Figure 6 : Aspect microscopique des cellules après coloration de Gram (G : X100).

Figure 7 : Proportion des bactéries lactiques par rapport à leur forme cellulaire.

Figure 8 : Répartition des différents genres des souches lactiques isolées à partir du lait cru de vache.

Figure 9 : Activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de 3 souches indicatrices (ATCC).

Figure 10 : Activité antimicrobienne des bactéries lactiques vis-à-vis des souches ATCC.

Figure 11 : Activité antimicrobienne de 3 souches lactiques vis-à-vis des germes pathogènes.

Figure 12 : Résultat du test de l'étude de la sensibilité d'une souche isolée (LVM S6) sélectionnée antagoniste aux antibiotiques.

Figure 13 : Observation des tubes germinatifs après le test de blastèse.

Figure 14 : Examen macroscopique de *Staphylococcus aureus*.

Figure 15 : Test de coagulase positif pour les deux souches de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et médicale.

Figure 16: Examen macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Figure 17: API 20E de *Pseudomonas aeruginosa* BMR.

Figure 18: API 20E de *Klebsiella pneumoniae* BMR.

Liste des tableaux :

Tableau I : Composition du lait de vache.

Tableau II : Source, date et l'origine de collecte des échantillons de lait de vache.

Tableau III : Liste des antibiotiques utilisés contre les entérobactéries et les *Pseudomonas* et les souches lactiques isolées du lait cru de vache.

Tableau IV : Les codes des souches lactiques isolées à partir du lait de vache.

Tableau V : Caractères microscopiques des isolats sur milieu MRS.

Tableau VI : Caractères microscopiques des isolats sur milieu M17.

Tableau VII : Distribution des genres de souches lactiques isolées à partir du lait de vache.

Tableau VIII : Lecture de la galerie API 20E.

Tableau IX : Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques du 1^{er} prélèvement.

Tableau X : Résultats de l'antibiogramme des souches lactiques du 2^{ème} prélèvement.

Tableau XI : Résultat de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau XII : Résultat de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine-Triphosphate.

BHIB : Bouillon Cœur-cerveille.

BL : Bactéries lactiques.

BMR : Bactéries multirésistantes.

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

CIT : Citrate de Simmons.

GEL : Gélatinase.

EMP : Embden Meyerhoff Parnas.

K.pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*.

LAB : Lactic Acid Bacteria.

LVM : Lait de vache pour les mésophiles.

LVT : Lait de vache pour les thermophiles.

MRS : Man Rogosa Sharpe.

NCTC : National Collection of Type Cultures.

TSA : Tryptone Soy Agar.

URE : Urée.

Résumé

Cette présente étude consiste à évaluer le pouvoir antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache contre des bactéries pathogènes d'origine alimentaire, clinique et des bactéries multirésistantes

Nous avons isolé et purifié 30 souches de bactéries lactiques à partir de deux échantillons du lait de vache collectés dans la région de Blida. L'identification microscopique, macroscopique et biochimiques a permis de caractériser les genres suivants : la prédominance de *Lactobacillus* suivi de *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Lactococcus*.

L'étude de l'antibiogramme a montré une résistance à l'oxacilline et la rifampicine chez la plupart des souches, 100% des souches lactiques sont sensibles à l'amoxicilline + acide clavulanique par contre 75% de souches lactiques sont sensibles à l'amikacine.

L'activité antifongique des isolats envers *Candida albicans* ATCC 10231 a montré un pouvoir inhibiteur important avec un diamètre de 28 mm. En revanche, aucune activité n'a été révélée à l'égard de *Candida albicans* du type pathogène. Les souches lactiques isolées sur milieu MRS, du genre *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* ont été testées pour leur pouvoir antagoniste par la méthode directe vis-à-vis des germes pathogènes (à Gram négatif et à Gram positif) et des souches ATCC, la totalité des souches est efficace. Un diamètre maximal (19 mm) est observé contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Mots clés : activité antifongique, bactéries lactiques, germes pathogènes, lait de vache, résistance, pouvoir antagoniste.

Abstract

The present study consists in evaluating the antagonistic power of lactic acid bacteria isolated from cow's milk against pathogenic bacteria of food, clinical and multi-resistant bacteria.

In this study, 30 strains of lactic acid bacteria were isolated and purified from two samples of cow's milk collected in the Blida region. Microscopic, macroscopic and biochemical identification revealed the following genera: *Lactobacillus* predominates, followed by *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Lactococcus*.

Resistance to oxacillin and rifampicin was recorded in most strains, while 100% were sensitive to amoxicillin + clavulanic acid, and 75% to amikacin.

The antifungal activity of isolates against *Candida albicans* ATCC 10231 showed significant inhibitory power with a diameter of 28 mm. However, no activity was revealed against pathogenic *Candida albicans*. *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* strains isolated on MRS medium were tested for their antagonistic power by the direct method against pathogenic germs (Gram-negative and Gram-positive) and ATCC strains, with all strains being effective. A maximum diameter (19mm) was observed against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Key words: antifungal activity, antagonistic power, cow's milk, lactic acid bacteria, pathogenic germs, resistance.

ملخص

تقيم هذه الدراسة القوة العدائية لبكتيريا اللاكتيك المعزولة من حليب البقر ضد البكتيريا الممرضة المنقولة عن طريق الغذاء و مقاومة للأدوية المتعددة

في هذه الدراسة، تم عزل وتنقية 30 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك من عينتين من حليب البقر تم جمعها في منطقة البلدة. كشف التعريف المجهرى والعيناني والكيميائي الحيوي عن الأجناس التالية: يسود *Lactobacillus*، يليه *Lactococcus*، *Streptococcus* و *Leuconostoc* و *Pediococcus*

تم تسجيل مقاومة الأوكساسيلين و الريفامبيسين في معظم السلالات، بينما كانت 100٪ حساسة للأموكسيسيلين + حمض الكلافولانيك، و 75٪ للأميكاسين.

أظهر النشاط المضاد للفطريات للعزلات ضد *Candida albicans* ATCC 10231 قوة مثبطة كبيرة بقطر 28 ملم. ومع ذلك، لم يتم الكشف عن أي نشاط ضد *Candida albicans* المسببة للأمراض. تم اختبار سلالات *Lactobacillus* و *Pediococcus* و *Leuconostoc* المعزولة على وسط MRS لقوتها المعادية بالطريقة المباشرة ضد الجراثيم المسببة للأمراض (سلبية الغرام و إيجابية الغرام) وسلالات ATCC، مع فعالية جميع السلالات. لوحظ قطر أقصى (19 مم) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

الكلمات الرئيسية: الجراثيم المسببة للأمراض، القوة العدائية، المقاومة، النشاط المضاد للفطريات، بكتيريا حمض اللاكتيك، حليب البقر.

Sommaire

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

CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur le lait	3
I.1 Définition du lait	3
I.2 Composition du lait	3
II. Bactéries lactiques	4
II.1 Définition et caractéristiques des bactéries lactiques	4
II.2 Habitat et origine	5
II.3 Métabolisme	5
II.4 Intérêts des bactéries lactiques	5
II.4.1 Dans le domaine alimentaire	6
II.4.2 Dans le domaine thérapeutique	7
III. L'antibiorésistance	7
IV. Microorganismes pathogènes et responsables d'altération des aliments	7
IV.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
IV.2 <i>Salmonella enterica</i>	8
IV.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
IV.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
IV.5 <i>Candida albicans</i>	9

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Objectif du travail	10
II. Matériel	
II.1.1 Matériel biologique	10
II.1.2 Matériel non biologique	10
III. Méthodes	11
III.1 Identification des microorganismes pathogènes	11
III.2 Isolement et identification des bactéries lactiques	13
III.2.1 Échantillonnage	13
III.2.2 Isolement des bactéries lactiques	13
III.2.2.1 Enrichissement	13
III.2.2.2 Préparation des dilutions décimales	13
III.2.2.3 Purification	14
III.2.3 Identification des bactéries lactiques	14
III.2.3.1 Etude des caractères morphologiques	14
III.2.3.2 Test préliminaire	15
III.2.4 Conservation des isolats lactiques purs	16
III.2.4.1 Conservation à court terme	16
III.2.4.2 Conservation à long terme	16
III.2.5 Etude de l'effet antagoniste des bactéries lactiques	17
III.2.5.1 Revivification des souches pathogènes	18
III.2.5.2 Méthode de spots	18
III.2.6 Antibiogramme	18

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats et discussion	21
I.1 Isolement et identification des germes pathogènes	21
I.2 Isolement des bactéries lactiques	21
I.3 Caractères morphologiques	21
I.3.1 Examen macroscopique	21
I.3.2 Examen microscopique	22
I.3.3 Caractéristiques biochimiques	25
I.4 Identification des souches	26
I.5 Conservation des isolats lactiques	28
I.6 Activité antimicrobienne des bactéries lactiques	29
I.6.1 Vis-à-vis des souches ATCC	29
I.6.2 Vis-à-vis des souches pathogènes	31
I.7 Détermination de profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries lactiques étudiées	33
Conclusion	36
Références bibliographiques	
Liste des annexes	

Introduction

Introduction

Le traitement par antibiotique a entraîné de graves problèmes tels que l'émergence de bactéries multirésistantes. La résistance microbienne aux antibiotiques et la présence de résidus dans les produits d'origine animale comme le lait sont très néfastes pour les consommateurs, conduisant à des tentatives de réduction de l'utilisation d'antibiotiques en production animale (**Faye, 2005**).

Depuis 2006, l'Union européenne a officiellement interdit l'utilisation d'antibiotiques comme additifs dans l'alimentation animale et humaine, ce qui a conduit au développement d'alternatives utilisant des microbes bénéfiques (probiotiques) ou des ingrédients non digestibles (comme les prébiotiques qui favorisent la croissance intestinale)(**Adil et al., 2011**).

Les bactéries lactiques, dotées de propriétés probiotiques sont largement utilisées depuis des siècles pour la fermentation et la bio conservation des nombreux aliments, afin d'assurer les exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et dépourvus de conservateurs alimentaires (**Dortu et Thonart, 2009 ; Ajao et al., 2021**). En secteur thérapeutique, ces bactéries sont considérées comme étant des agents bio thérapeutiques vis-à-vis de diverses infections, en produisant plusieurs composés antimicrobiens tels que : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol et les bactériocines. Les bactériocines ont suscité beaucoup d'intérêt dans la durée de la conservation des aliments ainsi que dans le contrôle des maladies infectieuses (**Heymann et Heulevin, 2006 ;Dortu et Thonart, 2009**).

Ces infections constituent un véritable problème de santé publique tant par leur fréquence et leur difficulté de traitement car elles contiennent des germes nuisibles qui ne peuvent être traitées que par les antibiotiques, le problème qui se pose alors est la résistance à ces derniers, De ce fait, les probiotiques seraient une alternative importante afin de faire face à ce phénomène.

Dans ce contexte, nous avons proposé dans cette présente étude d'apporter une contribution dans le domaine de la santé humaine, par la mise en évidence des bactéries lactiques pour la prévention des infections et des intoxications alimentaires tout en inhibant la croissance et la prolifération des germes pathogènes.

Les objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont :

- L'isolement, la purification et l'identification des souches lactiques collectées à partir du lait cru de vache.
- La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches de bactéries lactiques vis -à-vis de certaines souches pathogènes d'origine alimentaire et clinique.
- La mise en évidence de l'activité antagoniste contre les bactéries multirésistantes isolées à partir des infections urinaires à savoir (*Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*).
- Détermination de l'aspect sécuritaire en testant la sensibilité ou la résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques.

I. Généralités sur le lait

I.1 Définition du lait

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompues d'une femelle vache en bonne santé bien nourrie et sans être surmenée, le lait doit être recueilli proprement ne peut pas contenir du colostrum » (**Tapernoux, 1937**).

De manière générale, le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement thermique (échauffement) de manière à préserver suffisamment sa flore (bactéries lactiques), c'est le lait qui sort du pis d'un animal qui constitue la matière première de tous les types de vaches (**Laurence, 2013**).

I.2 Composition du lait

C'est un aliment de choix complet, il contient de graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et de 87% d'eau (**Tableau 1**). Son pH est de 6.7. C'est un substrat très favorable au développement des micro-organismes. Il est la matière première de plusieurs produits alimentaires (**Ciqual, 1995**).

Tableau I : Composition du lait de vache (**Tapernoux, 1937**).

Composants	Caractéristiques
Eau	Il représente 80-90 % de la composition totale.
Protéines	L'apport moyen en protéines est de 3 grammes pour 100 grammes. Le lait de vache contient des protéines de très bonne qualité nutritionnelle, sous forme soluble (lactal-bumine) et insoluble (caséine).
Lipides ou graisses	La teneur en matières grasses du lait est variable, de 0,2 à 3,5 %. Les lipides sont essentiellement des graisses saturées.
Sucres	Le lait de vache contient 5 grammes de lactose pour 100 ml de lait (Le lactose est un disaccharide, se compose de glucose et de galactose). Ces sucres ont des propriétés intéressantes au niveau de la flore digestive.
Minéraux et oligo-éléments	Le calcium est l'actif nutritionnel numéro un du lait. Il est essentiel pour la croissance et le maintien de la masse osseuse. La présence de vitamine D et de phosphore dans le lait le rend idéal pour absorber et fixer le calcium dans les os.
Vitamines	<ul style="list-style-type: none"> • Les vitamines dites hydrosolubles (solubles dans l'eau et lactosérum) : vitamines B et C. • Les vitamines dites liposolubles (dissoutes dans les graisses, donc dans la crème et le beurre) : vitamines A, D et E.

II. Bactéries lactiques

II.1 Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes unicellulaires, procaryotes organotrophes et non pathogènes, formant un groupe hétérogène composé de coques, coccobacilles et de bacilles (**Figure 1**), dont la principale fonction métabolique est la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (**Badis et al., 2005**).

Les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, Classe : Bacilli, Ordre : Lactobacillales contenant 6 familles : *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Aerococcaceae*. Ces familles comprennent 38 genres dont 10 considérés comme les plus associés aux aliments: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* et *Weissella* (**Vandamme et al., 2014 ; Papadimitriou et al., 2016**).

(A) *Lactococcus bulgaricus* (B) *Lactococcus lactis* (C) *Streptococcus thermophilus*



Figure 1 : Bactéries lactiques sous forme de bacilles (A), coques (B), coccobacilles (C) (Fessard, 2017).

Les bactéries lactiques sont des bactéries à coloration de Gram positive. Généralement, immobiles, non sporulées, anaérobies mais aéro-tolérantes. Dépourvues de cytochrome oxydase, nitrate réductase et de catalase. Cependant, certaines pseudo-catalase peuvent survivre en présence d'oxygène (Hogg, 2005).

Les bactéries lactiques peuvent croître sur une large gamme de température, bien que la plupart sont mésophiles ou thermophiles modérées avec une température optimale de 30°C et 40°C respectivement. Elles ont des besoins nutritionnels complexes. Elles sont exigeantes en vitamines, bases azotés, minéraux, glucides ou bien encore en dérivés d'acide nucléique (Desmazeaud, 1983 ; Tailliez, 2001 ; Bernardeau et al., 2006).

II.2 Habitat et origine

Selon Zarour (2012), les bactéries lactiques sont ubiquitaires et très fréquentes dans la nature. Elles colonisent non seulement le tractus digestif et les muqueuses des animaux, mais se trouvent ainsi dans leur environnement. Elles sont notamment présentes dans de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales. Les bactéries lactiques sont donc prédominantes au sein du microbiote naturel de nombreux aliments fermentés et y jouent un rôle important dans la bio-conservation ou l'altération.

II.3 Métabolisme

Les bactéries lactiques sont des microorganismes strictement fermentaires qui synthétisent leur ATP par phosphorylation (soit par la glycolyse ou par la voie d'Embden Meyerhoff Parnas EMP) au niveau du substrat. Les LAB sont classées en trois groupes différents en fonction des voies utilisées pour fermenter les glucides. On trouve, d'un côté, les bactéries lactiques homo-fermentaires qui transforment le glucose en acide lactique uniquement (Quelques espèces du

genre *Lactobacillus*). D'un autre côté, les bactéries lactiques hétéro-fermentaires qui produisent en plus de l'acide lactique, d'autres composants tels que l'éthanol et/ou de l'acide acétique selon les conditions (**Delavenne, 2012**). Ces dernières sont divisées en 2 sous-groupes :

- Les hétéro-fermentaires facultatives qui ne produisent pas de CO₂, notamment les espèces du genre *Lactobacillus* et la plupart des espèces des genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.
- Contrairement, aux hétéro-fermentaires obligatoires qui en produisent. Ces dernières comprennent les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et également quelques espèces du genre *Lactobacillus*.

II.4 Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont montré leurs intérêts dans le domaine alimentaire et thérapeutique.

II.4.1 Dans le domaine alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation des différents aliments et dans la bio-conservation en améliorant les caractéristiques organoleptiques des produits fermentés, grâce aux substances antimicrobiens qu'elles produisent, tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le dioxyde de carbone et les bactériocines. Elles sont utilisées ainsi dans la production du yaourt, des fromages, du lait fermenté (**Djadouni, 2013 ; Hammi, 2016 ; Zergoug, 2017**).

Les souches impliquées dans l'industrie agro-alimentaire doivent répondre à certains critères :

- Non pathogènes.
- Absence de toxicité active.
- Capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques.
- Facilité de culture et de conservation.
- Maintenance des propriétés souhaitables pendant le stockage.

II.4.2 Dans le domaine thérapeutique

D'après **Zergoug (2017)**, les bactéries lactiques comptent parmi les principaux probiotiques qui sont très bénéfiques pour le traitement des infections intestinales.

Selon des études antérieures, elles peuvent prévenir et traiter la diarrhée infectieuse. D'autres affirment que leur système protéolytique joue un rôle essentiel pour la diminution des allergies

dues aux aliments. Ces dernières années, les bactéries lactiques sont largement utilisées pour le traitement des infections vaginales et dans la préparation des vaccins.

- **L'utilisation des bactéries lactiques comme des probiotiques**

Metchnikoff et Tissier (1907) sont les premiers qui ont avancé des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries. Ces dernières sont utilisées comme additifs alimentaires, bénéfiques pour la flore intestinale car leur présence permet de contrer la prolifération des bactéries nuisibles et ils contribuent à la digestion des aliments chez l'Homme.

Plusieurs mécanismes interviennent dans le rôle bénéfique des probiotiques, citons quelques-uns :

- La production des acides organiques (acide lactique, acétique), de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines limitent le développement des bactéries pathogènes.
- L'administration des probiotiques empêchent les agents pathogènes de se fixer facilement et de provoquer des infections.
- Les probiotiques peuvent favoriser l'activité enzymatique des bactéries endogènes et permettant également une meilleure digestion des aliments (**Mami, 2013**).

III. Antibiorésistance

De nombreuses définitions existent pour exprimer la résistance bactérienne aux antibiotiques en fonction de différents critères génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques.

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est considérée comme résistante lorsqu'elle se développe avec des concentrations plus élevées de l'antibiotique que les autres souches (Les souches qui lui sont phylogénétiquement apparentées) (**Muylaert et al., 2012**).

Les bactéries lactiques présentes dans les aliments sont non-pathogènes (bénéfiques) mais elles peuvent transférer leurs gènes d'antibiorésistance aux bactéries intestinales dont les plus récurrentes sont les Bactéroides ou à des bactéries pathogènes d'origine alimentaire donc l'intestin humain représente un excellent réservoir de gènes de résistance.

Plusieurs études ont montré qu'une gamme importante de bactéries lactiques comme *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont sensibles à certains antibiotiques tels que le Pénicilline G, à l'ampicilline, à la tétracycline, à l'érythromycine et au chloramphénicol. Cependant, des éléments transposables conjugatifs ou plasmides qui portent des gènes de résistance à la tétracycline, à l'érythromycine, au chloramphénicol et à la

kanamycine sont très fréquents chez les bactéries lactiques. Contrairement au *Lactobacillus* qui se trouve dans les produits laitiers et qui porte des résistances intrinsèques connues aux aminoglycosides, aux quinolones et aux glycopeptides mais aussi au mélange triméthoprimé/sulfaméthoxazole et à la polymyxine B (Delavenne, 2012).

IV. Microorganismes pathogènes et responsables d'altération des aliments

Plusieurs micro-organismes sont responsables dans l'intoxication alimentaire à savoir :

IV.1 *Staphylococcus aureus*

D'après Tracey et al. (2022), *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus* dorée est une coque disposée en grappes de raisin, à Gram positif (coloration violette), appartenant à la famille des *Micrococcaceae*. Il mesure de 0,5 à 1 um de diamètre, non sporulé, immobile, aéro-anaérobie facultatif possédant une catalase et coagulase positive et fermentation du mannitol positive.

Les infections causées par cet agent pathogène sont fréquentes dans les milieux hospitaliers et communautaires (Vincenot et al., 2008).

Staphylococcus aureus est l'agent causal de multiples infections humaines, y compris la bactériémie, l'endocardite infectieuse, les infections de la peau et des tissus mous, ostéomyélite, arthrite septique, infections de prothèses, infections pulmonaires, gastro-entérite, méningite, syndrome de choc toxique et infections des voies urinaires (Tracey et al., 2022). *Staphylococcus aureus* est un pathogène humain important qui provoque non seulement des infections cutanées et respiratoires, mais aussi des intoxications alimentaires staphylococciques par sa production d'entérotoxines et d'autres superantigènes (Dongyou, 2015).

IV.2 *Salmonella enterica subsp enterica serovar abony*

Salmonella est un bacille à Gram négatif et oxydase négatif, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, non sporulant et généralement mobile en raison d'une architecture péritriche ciliée. Ces bâtonnets de 3,5 um de long sont des germes mésophiles aéro-anaérobies qui ne possèdent pas de capsule (Tabo, 2013).

Les salmonelles non typhiques sont des germes pathogènes intracellulaires humains, généralement d'origine alimentaire. Ces bactéries peuvent entraîner des gastroentérites aiguës accompagnées de maux de tête, douleurs abdominales, nausées, vomissements, fièvre, dont l'évolution est généralement rapide en quelques jours (David, 2009).

IV.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae*, qui forme des bâtonnets de 1 à 3 um de long sur 0,5-1 um de diamètre selon la souche. Elle est aussi appelée bacille pyocyanique (**Gessard, 1984**) en raison de la production de pigments bleus et verts par la bactérie : la pyocyanine et la pyoverdine. C'est une bactérie très mobile, ubiquitaire, retrouvée dans des environnements variés. Elle est souvent isolée dans les eaux mais également dans les sols et sur les surfaces des végétaux (**Biquand, 2017 ; Saffiedine, 2019**).

Chez l'homme, *Pseudomonas aeruginosa* est responsable d'un large spectre d'infections, aiguës ou chroniques : intestinales, oculaires (kératite), cutanées (folliculite et surinfections de brûlures), urinaires, respiratoires (sinusite, trachéo bronchite, pneumonie), bactériémie (**Fangous, 2019**).

Elle est notamment responsable de nombreuses infections nosocomiales, en partie dues à son adaptation à de nombreuses niches écologiques, mais surtout à sa capacité de résistance aux traitements, PA présente une résistance naturelle aux antibiotiques (**Biquand, 2017**).

IV.4 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et est décrite comme une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet ou coccobacille, immobile, aéro-anaérobie facultative, oxydase négative, fermentant le glucose et le lactose en produisant du gaz. C'est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve dans l'environnement (sols, eaux de surface,) ainsi que dans le système digestif humain (**Chikhani, 2012 ; Daffe, 2018**).

En milieu hospitalier, cette bactérie est un pathogène opportuniste à l'origine d'infections liées aux soins, notamment pulmonaires et urinaires. Grâce à sa capacité à former des biofilms, *K. pneumoniae* colonise facilement les épithéliums tels que ceux des voies aériennes supérieures et du tractus digestif, ainsi que des dispositifs médicaux invasifs (**Joseph, 2022**).

IV.5 *Candida albicans*

Le champignon pathogène opportuniste, *Candida albicans* est une levure aérobie non encapsulée, non pigmentée. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique est divisé en 8 chromosomes (**Chu et al., 1993**), se reproduit de manière asexuée par bourgeonnement

multilatéral d'une cellule mère (**Graser et al., 1996**), donnant ainsi des colonies blanchâtres crémeuses sur milieu Sabouraud (**Lagane, 2007**).

Les candidoses causées par les levures du genre *Candida* sont les infections opportunistes les plus courantes. Parmi les candidoses, les infections commensales du tube digestif humain dues à *Candida albicans*. En effet, ce champignon est responsable qui, par sa fréquence et sa gravité, se situe au premier rang des infections fongiques (**Lagane, 2007**).

I. Objectif du travail

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida, pendant 5 mois (de Février à Juin). Elle est basée sur 3 grandes parties :

- L'isolement, purification et l'identification des bactéries lactiques à partir du lait cru de vache de la région de Blida.
- Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis 3 souches de référence : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *abony*, *Candida albicans* et 5 germes pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* (BMR), *Klebsiella pneumoniae* (BMR).
- Détermination de l'aspect sécuritaire en testant la sensibilité aux antibiotiques.

II. Matériel

II.1. Matériel biologique

Pour la réalisation de la partie expérimentale, nous avons servi du matériel biologique suivant :

- Lait cru de vache : récolté de la région de Blida.
- Souches ATCC et NCTC : collection du laboratoire d'hygiène de Blida :
Staphylococcus aureus, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *abony*, *Candida albicans*
- Souches pathogènes d'origine alimentaire et clinique :
 - **Staphylococcus aureus* : isolée à partir d'un plat de poulet.
 - **Candida albicans* : isolée à partir de Charbet (boisson).
 - **Staphylococcus aureus* : isolée à partir des urines.
 - **Pseudomonas aeruginosa* (BMR) : isolée à partir des urines.
 - **Klebsiella pneumoniae* (BMR) : isolée à partir des urines.

II.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique (l'appareillage, la verrerie, les milieux de culture et les réactifs) utilisé dans cette étude est décrit en **annexe I**.

III. Méthodes

III.1 Identification des microorganismes pathogènes

Nous avons collecté des souches pathogènes d'origine alimentaire et médicale à partir du laboratoire d'hygiène de Blida, et des bactéries multirésistantes à partir des infections urinaires au niveau de l'hôpital de Koléa. L'identification des souches collectées est réalisée par des tests biochimiques spécifiques.

III.1.1 *Candida albicans*

L'identification de la souche isolée est basée sur l'aspect morphologique des colonies et sur le test de blastèse.

III.1.1.1 Test de blastèse (Test de germination)

✓ Principe

Ce test décrit par Taschdjian en 1960 et inspiré des travaux de **Reynolds et Braune (1956)**, qui ont montré que les constituants du sang favorisent la formation de filaments par certaines levures.

✓ Technique

La souche à tester estensemencée dans 1 ml de sérum humain, puis incubée à 37 °C pendant 3 à 4 heures. L'observation au microscope optique (Grossissement $\times 40$) est réalisée pour visualiser la formation des tubes germinatifs (**Bouchet et al., 1989**).

III.1.2 *Staphylococcus aureus*

Nous avons collecté une bactérie d'origine alimentaire isolée à partir d'un plat de poulet, et d'origine clinique isolée à partir des infections urinaires. Ces souches sont analysées au niveau du laboratoire d'hygiène en effectuant l'ensemble des tests microbiologiques. Afin de confirmer ce résultat, nous avons réalisé un test de la coagulase.

III.1.2.1 Test de la coagulase

✓ Principe

La coagulase est une protéine extracellulaire, permettant la différenciation des staphylocoques à coagulase positive (SCP) des staphylocoques à coagulase négative (SCN). Ce test consiste à mettre en évidence que les souches de *Staphylococcus aureus* sont capables de coaguler le plasma humain ou de lapin (Singleton, 2005).

✓ Technique

Mettre 2 à 5 colonies dans un tube à réaction contenant 1 ml de plasma citraté, oxalaté ou hépariné. Bien homogénéiser, boucher le tube par un coton. Mettre à l'étuve à 37°C, le tube contenant ainsi la suspension pendant 3 heures. La coagulation peut apparaître dans les premières, deuxièmes et troisièmes heures d'incubation (Allassane, 2001).

✓ **Lecture :** La réaction est considérée comme positive lors de la formation d'un coagulum qui se traduit par la coagulation du plasma, interviennent avant 24h.

III.1.3 Les bactéries multirésistantes

Nous avons procédé à l'identification de deux bactéries multirésistantes à Gram négatif à savoir : *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, en utilisant une galerie miniaturisée API 20E.

III.1.3.1 Galerie miniaturisée (Api 20E)

✓ Principe

C'est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substances déshydratées (Figure 2).

✓ Technique

Les microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland. Ensemencement de la suspension bactérienne dans chaque microtube à l'aide d'une micropipette ou la pointe de l'embout est appuyé sur le côté inférieur pour éviter la formation de bulles d'air. Les microtubes des tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE ont été remplis par l'inoculum puis recouvrir par une couche de l'huile de paraffine, tandis que les microtubes CIT, VP et GEL sont remplis de la suspension jusqu'à la cupule. Puis, renfermer la boîte et incubé à 37°C pendant 18h à 24h.

- ✓ **Lecture** de ces réactions s'effectue à l'aide du tableau de lecture et d'identification en consultant la liste des profils de la notice ou à l'aide d'un logiciel d'identification.



Figure 2 : Galerie API 20E.

III.2 Isolement et identification des bactéries lactiques

III.2.1 Echantillonnage

Deux échantillons du lait sont aseptiquement prélevés à partir d'une vache saine et non traitée par les antibiotiques, de la région de Blida (**Tableau II**). Les prélèvements sont réalisés comme suit :

- Un nettoyage préalable de l'extérieur de la mamelle à l'aide d'un linge préalablement trempé dans une solution désinfectante, la mamelle doit ensuite être séchée.
- Se laver soigneusement et se sécher les mains avant la traite.
- Les premiers jets de lait sont éliminés.
- Les échantillons sont recueillis dans des flacons stériles de 250 ml en raison de 100 ml/flacon, étiquetés et acheminés dans une glacière (4°C) au laboratoire.

Tableau II : Source, date et l'origine de collecte des échantillons de lait de vache.

Les échantillons	Source	Date	Origine
Echantillon 1	Lait de vache	Février	Blida
Echantillon 2	Lait de vache	Mars	Blida

III.2.2 Isolement des bactéries lactiques

III.2.2.1 L'enrichissement

La première étape de l'enrichissement est réalisée par l'incubation du lait à 37°C pour les bactéries lactiques mésophiles et à 42°C pour les streptocoques et lactocoques jusqu'à sa

coagulation (24h jusqu'à 48h). Cette étape permet aux bactéries lactiques de se proliférer et ce pour assurer leur présence lors de l'isolement (**Mammeche, 2008**).

III.2.2.2 Préparation des dilutions décimales

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Dans ce but, des dilutions décimales sont ensuite réalisées en cascade à partir du lait de vache, jusqu'à la dilution 10⁻⁹. A partir de la dernière dilution, des ensemencements sont faits en profondeur sur milieu MRS, qui favorise la croissance des lactobacilles et sur milieu M17 pour la croissance des streptocoques et lactocoques. L'incubation des boîtes se fait à une température de 37°C pour les lactobacilles et à 42°C pour les streptocoques thermophiles pendant 24h à 72h (**Jerome et al., 2004**).

III.2.2.3 Purification

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon et gélose MRS et M17 jusqu'à l'obtention des colonies pures présentant les mêmes caractéristiques (même forme, même aspect et même couleur) (**Badis et al., 2005**). La purification est confirmée microscopiquement après coloration de Gram.

III.2.3 Identification des bactéries lactiques

III.2.3.1 Etude des caractères morphologiques

III.2.3.1.1 Examen macroscopique

Il s'agit d'une observation visuelle de la culture des souches sur gélose (MRS et M17), pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies. Seulement les bactéries présentant une couleur blanchâtre ou jaunâtre de taille varie entre 1 et 2 mm et une forme lenticulaire, seront prises pour les tests suivants (**Bergey's Manual, 2009**).

III.2.3.1.2 Examen microscopique

L'observation microscopique permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur forme et leur mode de regroupement. Les bactéries lactiques micro-morphologiquement présentent les caractéristiques suivantes : Gram positif, forme coccique, bacillaire ou coccobacille et de mode de regroupement variable (**Bergey's Manual, 2009**).

III 2.3.1.2.1 Coloration de Gram

✓ Principe

Cette technique est parmi les techniques de coloration différentielle la plus utilisée, elle permet non seulement d'observer la forme des cellules mais aussi de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiquement différents (**Tortora et al, 2003**), par rapport à la structure de la paroi bactérienne (**Guiraud, 1998**).

✓ Technique

Réaliser un frottis sur une lame propre :

- Colorer le frottis avec du violet de gentiane durant 1 min.
- Rincer à l'eau du robinet et ajouter le lugol pendant 1 min.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Décolorer à l'alcool 96° durant 15 sec.
- Faire une contre coloration avec de la fuschine durant 1 min.
- Rincer à l'eau, sécher la lame entre de papier.
- Observer au microscope optique (G x100) en ajoutant une goutte de l'huile à immersion.

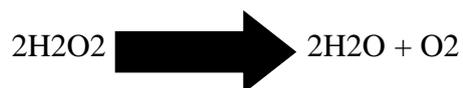
✓ **Lecture** : Les bactéries à Gram positives apparaissent en violet alors que les Gram négatives apparaissent en rose.

III.2.3.2 Test préliminaire

III.2.3.2.1 Test de la catalase

✓ Principe

La catalase est une enzyme retrouvée chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) et en oxygène (O₂) selon la réaction suivante (**Guiraud, 2003**) :



✓ Technique

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) dans laquelle sera dissociée une colonie.

- ✓ **Lecture** : La présence de catalase se manifeste par une effervescence qui indique une formation de bulles d'air, dues à la dégradation de l'eau oxygénée. Les bactéries lactiques sont à catalase négative.

III.2.4 Conservation des isolats lactiques purs

Deux types de conservation ont été réalisés (**Badis et al., 2005 ; Brahimi, 2015**).

III.2.4.1 Conservation à court terme

Les isolats purs ont été ensemencés dans des tubes de gélose inclinés (MRS et M17). Après incubation à 37°C pour les lactobacilles et 42°C pour les streptocoques, pendant 24h, les tubes ont été placés à 4°C au réfrigérateur et le renouvellement des souches se fait toutes les 4 semaines.

III.2.4.2 Conservation à long terme

La conservation à long terme des isolats a été réalisée sur bouillon MRS et M17 additionné à 30% de glycérol stérile et elles ont été stockées dans des eppendorfs, à une température de -20°C.

La figure suivante (**Figure 3**) résume le protocole d'isolement des bactéries lactiques.

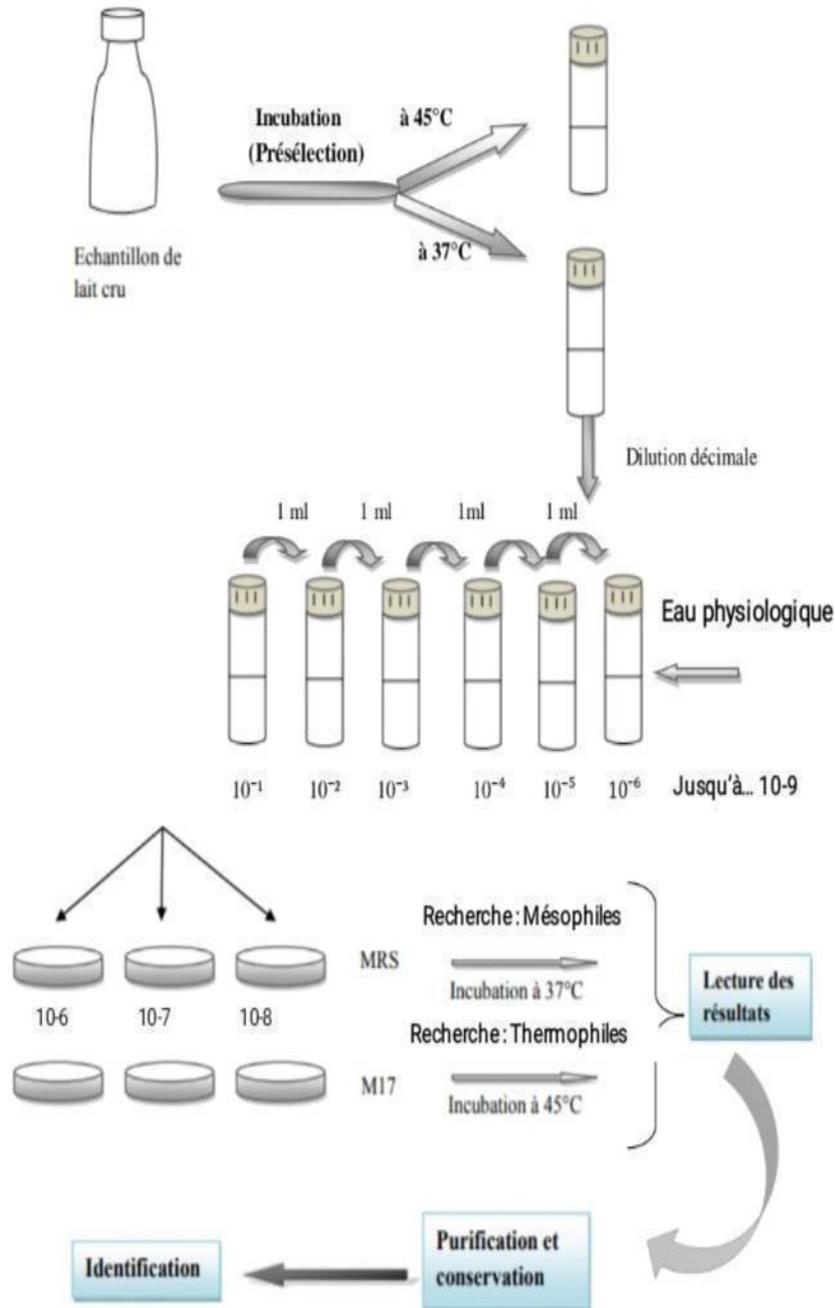


Figure 3 : Protocole d'isolement des bactéries lactiques.

III.2.5 Etude de l'effet antagoniste des bactéries lactiques

L'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode directe (méthode de spots), vis-à-vis 3 souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *abony* NCTC 6017 et *Candida albicans* ATCC 10231, et à l'égard de 5 germes pathogènes : *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et médicale, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* (BMR), *Klebsiella pneumoniae* (BMR).

III.2.5.1 Revivification des souches pathogènes

Les bactéries pathogènes testées sont cultivées à 37°C sur 5 ml de bouillon BHIB, pendant 24h.

III.2.5.2 Méthode de spots (Méthode de Fleeming et al., 1975)

A partir des pré-cultures des souches lactiques sélectionnées obtenues après 18h d'incubation à 37°C et 42°C. Des aliquotes de 5 µl ont été déposées sur la surface des boîtes de gélose du milieu de croissance respectif. Ces boîtes sont laissées séchées près du Bec bunsen pendant environ 30 minutes. Après une incubation de 24h à 37°C et 42°C pour MRS et M17 respectivement, les boîtes ont été ensuite recouvertes d'une couche de gélose molle TSA inoculées en surfusion à raison de 1% d'une pré-culture de 24h de chaque souche indicatrice. Après solidification, les boîtes ont été incubées à 37°C et 42°C pendant 24h et les diamètres des halos d'inhibition contre les souches indicatrices utilisées ont été mesurés en millimètres à l'aide d'une pied coulisse (**Figure 4**).

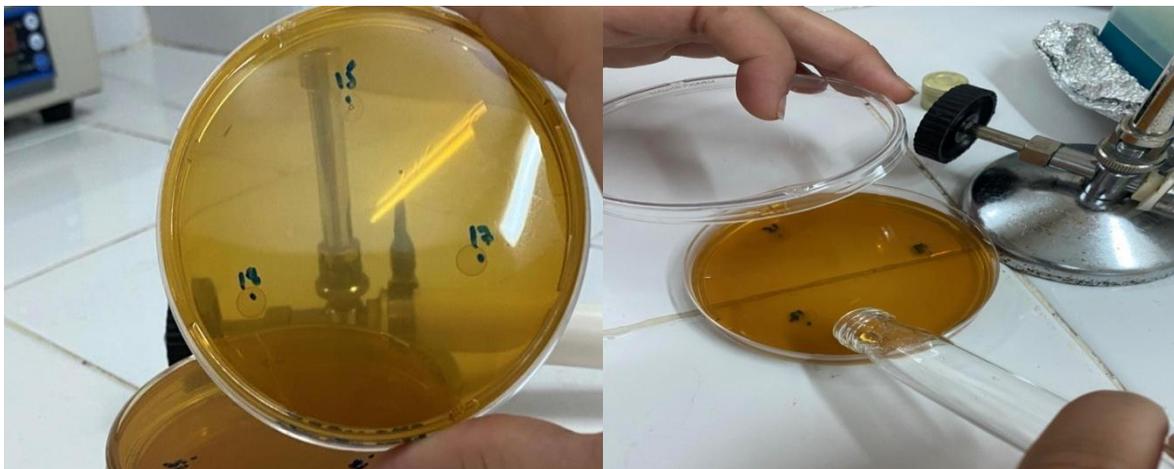


Figure 4: Réalisation de l'activité antimicrobienne par la méthode de spots.

III.2.6 Antibiogramme

✓ Principe

C'est un test *in vitro* qui permet de déterminer la sensibilité des souches lactiques isolées à partir du lait de vache et les bactéries multirésistantes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques afin d'adapter une antibiothérapie ou pour un suivi épidémiologique.

L'étude de résistance ou sensibilité aux antibiotiques est réalisée par la technique de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques (**Tableau III**) sur milieu Mueller-Hinton selon les

recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française (**Karam et Karam, 1994 ; Benabou, 2012**).

✓ Technique

L'inoculum est préparé à partir d'une souche bactérienne jeune de 18 heures. Puis, ajusté à 0,5 Mc Farland. L'ensemencement s'est fait par écouvillonnage sur toute la surface de la gélose, de haut en bas et en stries serrées, en tournant la boîte 60° deux fois et sans oublier la périphérie de la gélose. Par la suite, les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose (5 antibiotiques par boîte) à l'aide d'une pince bactériologique stérile, en appuyant doucement afin d'assurer un contact uniforme avec le milieu. Les boîtes sont laissées à la température ambiante pendant 15 minutes permettant la diffusion de l'antibiotique dans la gélose. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 18 à 24 heures (**Tableau III**).

✓ **Lecture** : La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques puis comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM (**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2013**). Le résultat est interprété sensible, intermédiaire ou résistant.

Tableau III : Liste des antibiotiques utilisés contre les entérobactéries et les *Pseudomonas* et les souches lactiques isolées du lait cru de vache

Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
Contre les entérobactéries			
Amoxicilline	AMX	25	B-lactamines
Amoxicilline+A.clavulanique	AMC	30	
Ampicilline	AMP	10	
Cefazoline	CZ	30	
Cefotaxime	CTX	30	
Imipeneme	IMP	10	
Amikacine	AK	30	Aminosides
Gentamicine	CN	10	Quinolones
Acide nalidaxique	NA	30	
Ciprofloxacine	CIP	30	
Chloromphénicol	C	30	Phénicolés
Cotrimoxazole	COT	25	Diaminopyrimidines
Contre les <i>Pseudomonas</i>			
Céftazidime	CAZ	30	B-lactamines
Pipéracilline	PRL	100	
Ticarcilline	TC	75	
Ticarcilline+A.clavulanique	TIM	85	

Imipenem		IMP	10	
Gentamicine		CN	10	Aminosides
Tobramycine		TOB	10	
Amikacine		AK	30	
Ciprofloxacin		CIP	30	Fluoroquinolones
Contre les bactéries lactiques				
Amoxicilline + A. clavulanique		AMC	30	B-lactamines
Cefotaxime		CTX	30	
Oxacilline		OX	5	
Amikacine		AK	30	Aminosides
Erythromycine		E	15	Macrolides
Tetracycline		TE	30	Tetracyclines
Rifampicine		RIF	30	Rifamycines
Acide fusidique		FC	10	Fusidanines
Ciprofloxacin		CIP	10	Fluoroquinolones

I. Résultats et discussion

Notre travail consiste à étudier l'activité antagoniste des souches lactiques isolées à partir de 2 prélèvements du lait de vache. Cette activité est testée sur 5 souches pathogènes d'origine alimentaire, clinique et d'autres appartenant à la collection « ATCC ». Pour déterminer l'aspect sécuritaire de ces dernières, le test de la sensibilité aux antibiotiques a été également réalisé.

I.1 Isolement et identification des germes pathogènes

Les résultats de cette partie sont représentés dans l'**annexe II**.

I.2 Isolement des bactéries lactiques

Dans cette présente étude, 39 souches sont isolées et purifiées sur les milieux MRS et M17. Ces milieux sont très adaptés à la recherche spécifique des bactéries lactiques (BL). Les isolats sont désignés par un code constitué de trois lettres et d'un chiffre du S1 au S22.

(LVM): lait de vache pour les mésophiles, (LVT) : lait de vache pour les thermophiles. (**Tableau IV**).

Tableau IV : Les codes des souches lactiques isolées à partir du lait de vache.

Milieux d'isolement	Codes des souches isolées	
MRS	LVM S1	LVM S 22
M17	LVT S1	LVT S13

(LVM): lait de vache pour les mésophiles, (LVT) : lait de vache pour les thermophiles.

Il est à noter que nous avons rencontré des difficultés lors de l'isolement des souches lactiques puisque celles-ci ont des exigences nutritionnelles nombreuses et complexes (**Desmazeaud, 1983 ; Tailliez, 2001 ; Bernardeau et al., 2006**). L'identification des isolats lactiques au stade genre est réalisée en utilisant des tests portant sur les caractéristiques culturelles, morphologiques (macro-microscopique) et biochimique.

I.3 Caractères morphologiques

I.3.1 Examen macroscopique

L'observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux MRS et M17 et de déterminer les critères relatifs à celles des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect).

Nous avons observé à l'œil nu et sur milieu solide des colonies ayant un diamètre d'environ 1 à 2 mm, et de couleur blanchâtre ou jaunâtre, d'une forme lenticulaire et avec un aspect crémeux (**Figure 5**). Par contre, l'examen macroscopique en milieu liquide nous a permis d'observer un

trouble assez dense comparativement au témoin, ce qui indique une croissance bactérienne au fond du tube.



Figure 5 : Aspect macroscopique des colonies d'une souche lactique (LVT S13) isolée sur milieu M17.

I.3.2 Examen microscopique

L'observation microscopique au G X100, nous a permis d'identifier 30 souches sur 39 isolats sont des bactéries lactiques à Gram positives avec différentes formes cellulaires et un mode de regroupement variable, à savoir (**Figure 6**):

- En bacille (bâtonnet) isolé, en chaînette ou en diplobacille (**Figure 6 A**).
- En cocci disposé en diplocoque, en tétrade, en chaînette, en amas ou isolé (**Figure 6 B**).
- En coccobacille disposé en chaînette, en tétrade, en deux ou isolé (**Figure 6 C**).

Selon **Hogg (2005)**, les bactéries lactiques (BL) sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies facultatives, de catalase et oxydase négatives et généralement nitrate réductase négative.

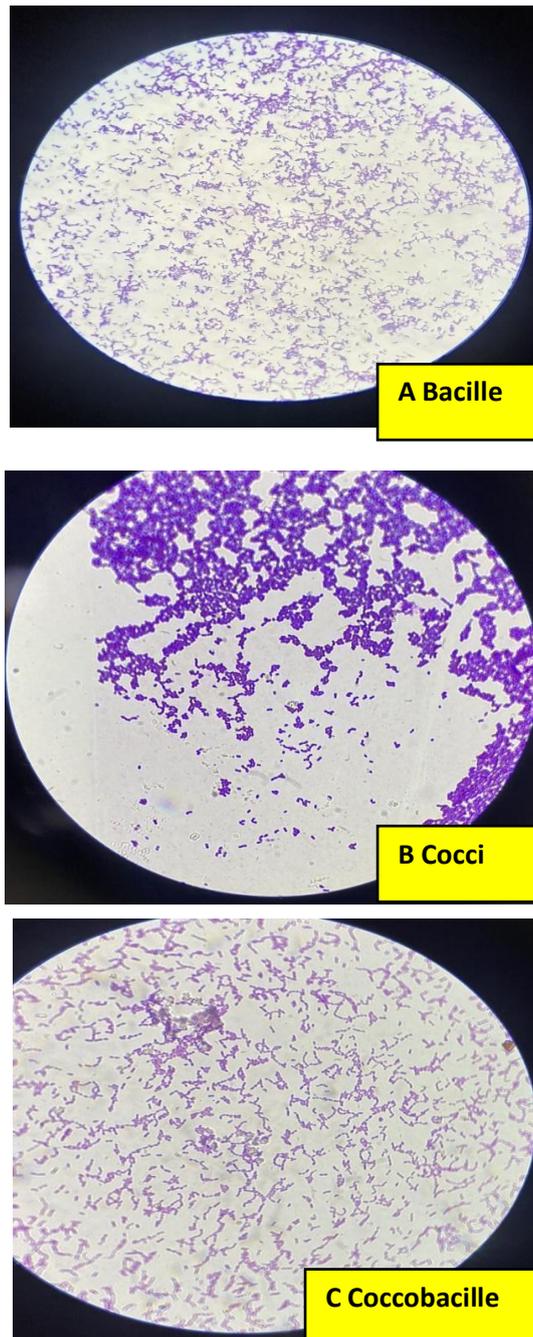


Figure 6 : Aspect microscopique des cellules après coloration de Gram (G : X100).(A) : Bacille, (B) : Cocci,(C) : Coccobacille

Au cours de cette étude, nous avons isolé 22 souches sur le milieu solide (MRS) et 17 souches sur le milieu solide (M17). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Mami (2013)**. Ces dernières ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique et biochimique. Les résultats des caractères microscopiques des 30 souches isolées à partir du lait de vache sont synthétisés dans les tableaux **V** et **VI**.

Tableau V : Caractères microscopiques des isolats sur milieu MRS.

(LVM) : Lait de vache pour les mésophiles, (LVT) : Lait de vache pour les thermophiles.

Souches	Gram	Forme	Mode de regroupement
LVM S1	+	Cocci Coccobacille	en amas- en tétrade- en diplocoque en chaînette
LVM S2	+	Coccobacille	en diplobacille - en chaînette
LVM S3	+	Cocci Coccobacille	en amas- en tétrade- en diplocoque en chaînette
LVM S4	+	Coccobacille	en diplobacille
LVM S5	+	Coccobacille	en chaînette- en diplobacille
LVM S6	+	Coccobacille	en diplobacille
LVM S7	+	Bacille	isolé- en chaînette -en diplobacille
LVM S8	+	Bacille Cocci	en chaînette en diplocoque
LVM S9	+	Coccobacille Cocci	en diplobacille en chaînette
LVM S10	+	Cocci	en chaînette
LVM S11	+	Cocci Coccobacille	en amas en chaînette- en diplobacille
LVM S12	+	Cocci	en diplocoque- en tétrade
LVM S13	+	Cocci Coccobacille	en chaînette- en diplocoque isolé
LVM S14	+	Cocci	en chaînette
LVM S15	+	Coccobacille Cocci	en chaînette- en diplobacille en chaînette- en amas
LVM S16	+	Coccobacille Cocci	en diplobacille en diplocoque
LVM S17	+	Cocci Coccobacille	en diplocoque- en chaînette- en amas en diplobacille
LVM S18	+	Bacille	en diplobacille- en chaînette

LVM S19	+	Cocci Coccobacille	en chaînette- en amas- en tétrade en diplobacille
LVM S20	+	Cocci Coccobacille	en chaînette- en diplocoque- en tétrade en diplobacille
LVM S21	+	Coccobacille	en chaînette
LVM S22	+	Cocci Coccobacille	en amas- en diplocoque en chaînette

Tableau VI : Caractères microscopiques des isolats sur milieu M17.

Souches	Gram	Forme	Mode de regroupement
LVT S3	+	Cocci	en diplocoque
LVT S5	+	Cocci	en chaînette- en diplocoque- en amas
LVT S7	+	Cocci	en chaînette- en amas- en diplocoque
LVT S8	+	Cocci	en amas -en diplocoque
LVT S9	+	Cocci	en diplocoque- en tétrade- isolé- en tétrade
LVT S10	+	Cocci	en chaînette- en diplocoque
LVT S12	+	Cocci	en diplocoque- en chaînette- en tétrade
LVT S13	+	Cocci	en diplocoque- en chaînette- isolé

1.3.3. Caractéristiques biochimiques

✓ Test de la catalase

La confirmation de la pureté des souches est complétée par la recherche de l'enzyme catalase. Nous avons noté l'absence de la formation des bulles d'air donc l'absence de cette enzyme, ce qui reflète l'incapacité de ces souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène (Catalase négative). Sur les 39 isolats, nous avons noté 30 souches à catalase négative et 9 souches à catalase positive.

Nos résultats sont en accord avec les données de **Bekhouche et al. (2005)**, qui a mené des études sur la quantité et la qualité des bactéries lactiques de lait cru produites par des vaches locales dans six stations d'élevage à Constantine (66 souches).

I.4 Identification des souches

Sur la base des résultats macroscopiques, microscopiques et biochimiques (test de catalase) et en se référant à Bergey's Manual of Systemic Bacteriology 2nd edition, nous avons pu supposer le genre des souches lactiques isolées.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau VII : Distribution des genres de souches lactiques isolées à partir du lait de vache.

Souches	Formes	Genres
LVM S1	Cocci / Coccobacille	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S2	Coccobacille	<i>Lactobacillus</i>
LVM S3	Cocci	<i>Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S4	Coccobacille	<i>Lactobacillus</i>
LVM S5	Coccobacille	<i>Lactobacillus.</i>
LVM S6	Coccobacille	<i>Lactobacillus</i>
LVM S7	Bacille	<i>Lactobacillus</i>
LVM S8	Bacille/ Cocci	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S9	Coccobacille/ Cocci	<i>Lactobacillus- Leuconostoc</i>
LVM S10	Cocci	<i>Leuconostoc</i>
LVM S11	Cocci / Coccobacille	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S12	Cocci	<i>Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S13	Cocci/ Coccobacille	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S14	Cocci	<i>Leuconostoc</i>
LVM S15	Coccobacille/ Cocci	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S16	Coccobacille/ Cocci	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S17	Cocci/ Coccobacille	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S18	Bacille	<i>Lactobacillus</i>
LVM S19	Cocci/ Coccobacille	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S20	Cocci/ Coccobacille	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVM S21	Coccobacille	<i>Lactobacillus</i>
LVM S22	Cocci/ Coccobacille	<i>Lactobacillus- Pediococcus- Leuconostoc</i>
LVT S3	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>
LVT S5	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>
LVT S7	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>
LVT S8	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>
LVT S9	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>
LVT S10	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>
LVT S12	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>

LVT S13	Cocci	<i>Streptococcus- Lactococcus</i>
---------	-------	-----------------------------------

Bien que le milieu MRS soit sélectif pour les lactobacilles qui sont caractérisées microscopiquement par une forme bacillaire ou coccobacillaire, dans notre étude des souches de forme coccique est observée sur ce milieu. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Bahri (2014)**, qui a noté que quelques espèces de BL appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* peuvent s’y développer sur le milieu MRS. Par ailleurs, il ne permet pas la croissance des autres BL à cause de la présence de l’acétate, comme *Carnobacterium* et les *Bifidobactéries* qui exigent l’addition de la cystéine au milieu de culture.

D’après **Bekhouche et al. (2005)**, les genres *Streptococcus* et *Lactococcus* sont mis en évidence sur milieu M17 gélosé, et sont caractérisés par une forme coccique.

L’observation microscopique des souches isolées a révélé la présence de deux différentes formes de cellules (Coques et Bacille/Coccobacille) (**Figure 7**). Les coques (de forme diplocoques, en chaînette, en tétrade ou isolé) sont représentées par les genres : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* et les formes bacillaires/ coccobacillaires sont représentées par le genre *Lactobacillus*.

D’après la figure 7, nous avons constaté une prédominance de la forme coccique avec un pourcentage de 70% devant 30% qui représente la forme bacillaire. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par d’autres études menées dans les produits laitiers, tels que les travaux réalisés par **Bekhouche et al. (2005)** et **Saidi et al. (2002)**. Contrairement aux résultats notés par **Tahlaiti (2019)** qui a constaté majoritairement la présence des bacilles (69,23%) par rapport aux coques (30,76%). Selon **Saidi et al. (2002)**, les genres des bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du lait cru et des conditions d’analyse. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante.

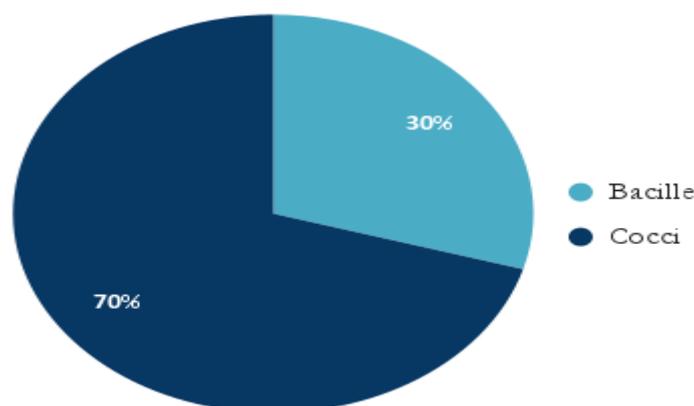


Figure 7 : Proportion des bactéries lactiques par rapport à leur forme cellulaire.

L'observation microscopique a révélé une diversité des genres de bactéries lactiques. La prédominance des lactobacilles (29%) suivi de *Leuconostoc*, *Pediococcus*, alors que les deux genres *Streptococcus* et *Lactococcus* sont représentés de façon similaire (13%). Des résultats proches ont été rapportés par **Badis et al. (2005)**, dans la caractérisation des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre d'une population kabyle. Notant également, le régime alimentaire (pauvre ou riche en nutriments) et l'état de santé de la vache déterminent la diversité des ferments lactiques dans le lait de vache.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 8.

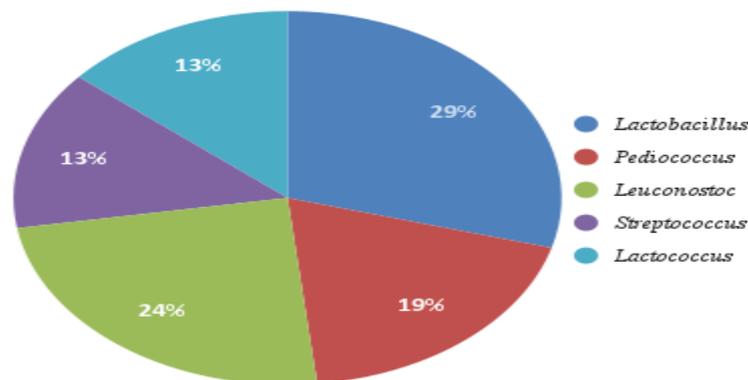


Figure 8 : Répartition des différents genres de souches lactiques isolées à partir du lait cru de vache.

I.5 Conservation des isolats lactiques

Seulement les isolats purs à Gram positif et catalase négative sont conservés. 30 isolats lactiques sont conservés par les deux méthodes (à court et à long terme). Après revivification, seulement les souches isolées sur milieu MRS, ont poussé et sont utilisées pour la suite de l'étude, les souches isolées sur milieu M17 n'ont pas poussé, suite à plusieurs facteurs : la non performance des souches, la médiocrité de la qualité du milieu ou du glycérol, une rupture liée au froid.

I.6 Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

L'activité antimicrobienne des souches lactiques isolées est étudiée par la technique des spots, contre plusieurs bactéries pathogènes d'origine médicale et alimentaire. Une étude similaire contre trois souches de référence ATCC est aussi réalisée.

Les prés-cultures de bactéries lactiques isolées sélectionnées et les souches indicatrices sont inoculées dans un milieu de culture liquide de MRS et dans un bouillon BHIB respectivement. Le test de l'activité antagoniste est effectué sur milieu de culture gélosé de MRS selon la technique

directe (Fleming et al., 1975), elle se traduit par la formation d'un halo autour de la souche ensemencée en touche dont il faudrait mesurer le diamètre, la lecture des résultats consiste à mesurer le rayon de le halo d'inhibition (Figure 9).

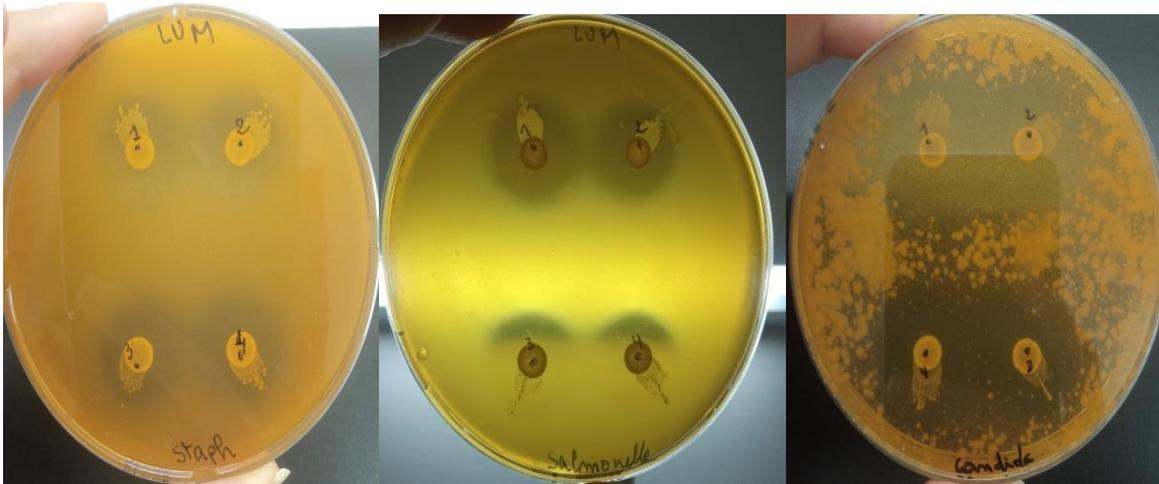


Figure 9 : Activité antimicrobienne des bactéries lactiques à l'égard de 3 souches indicatrices (ATCC).

Les résultats de l'activité antagoniste sont représentés sous forme d'histogrammes pour les trois types de souches testées (ATCC, pathogènes d'origine clinique et alimentaire). La répartition des isolats est réalisée en fonction des diamètres des halos clairs. Selon Dembélé (1998), les inhibitions dont les diamètres sont ≥ 1 mm sont considérées comme un résultat positif.

1.6.1. Vis-à-vis des souches ATCC

D'après les résultats obtenus de la Figure 10, nous avons noté des zones d'inhibition variables avec l'ensemble des souches ATCC testées.

- Le diamètre d'inhibition le plus élevé est enregistré avec la souche LVM S21 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Ces résultats sont nettement supérieurs par rapport à ceux de Sakoui et al. (2022), qui a rapporté que les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du guano de chauve-souris au Maroc, varient entre 10mm et 15mm à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC 114. Cependant, Mami et al. (2008), ont mentionné que les souches lactiques isolées du lait cru de chèvre inhibent des souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, avec des diamètres variant entre 16mm et 28mm, ces données sont supérieures à celles citées dans notre étude.
- La souche LVM S3 possède un pouvoir inhibiteur élevé à l'égard de *Salmonella enterica* NCTC 6017, avec un diamètre de 17,5 mm. Contrairement à d'autres souches qui ont un

diamètre faible estimé à 10mm. Les travaux de **Bouguerra (2022)**, ont rapporté que les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle de la région d'Oued Souf, sont de l'ordre de 12mm et 34mm vis-à-vis de *Salmonella spp.* Ces valeurs sont supérieures à celles que nous avons obtenues dans notre étude. Nos résultats sont conformes aux résultats de **Hammi (2016)**, qui a noté que les souches lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français, ont une activité antibactérienne à l'égard de *Salmonella spp* avec des diamètres d'inhibition variant de 0 mm à 16 mm.

- Les résultats de l'activité antifongique contre le champignon *Candida albicans*, ont montré que la souche LVM S1 possède le plus large pouvoir inhibiteur avec un diamètre de 28mm, tandis que la souche LVM S18 ne révèle aucune activité antifongique (0mm). Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **Bulgasem et al. (2018)**, où les diamètres obtenus se situent entre 6mm et 10mm.

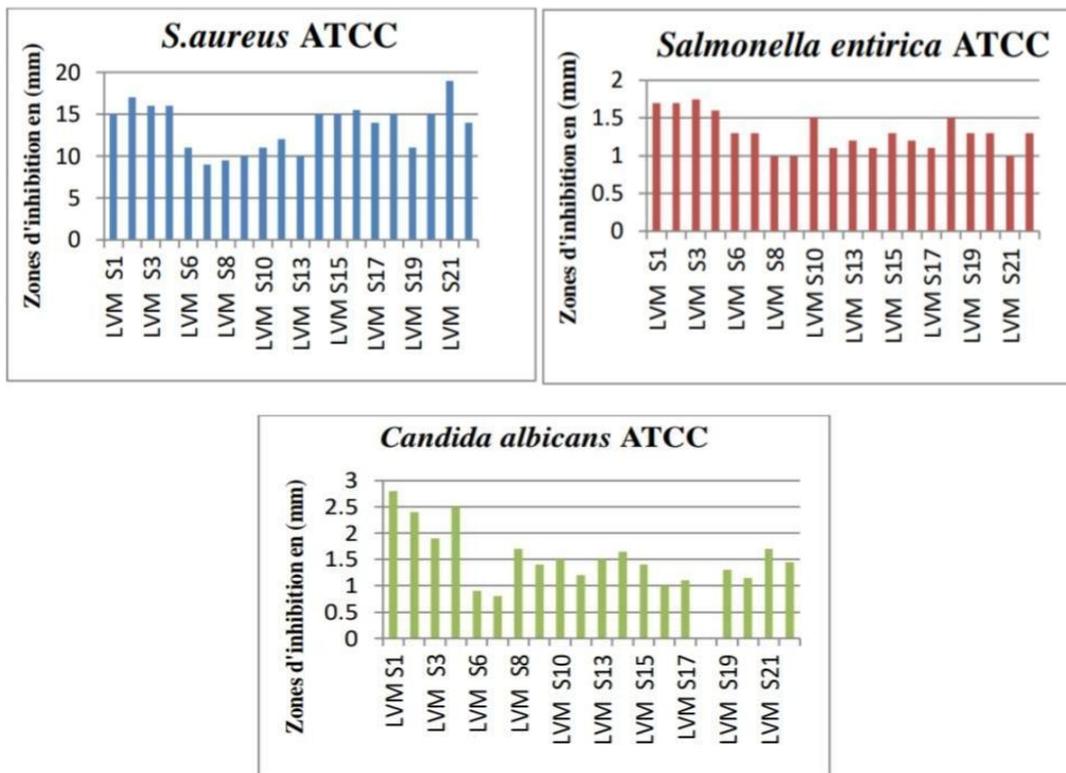


Figure 10 : Activité antimicrobienne des bactéries lactiques vis-à-vis des souches ATCC.

I.6.2 Vis-à-vis des souches pathogènes

Les résultats de l'activité antagoniste vis-à-vis les bactéries pathogènes d'origine alimentaire, médicale et sur le champignon *Candida albicans* sont représentés sur la figure 11. Nous avons enregistré des spectres d'inhibitions variables d'une souche à l'autre. Les souches lactiques ne

présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des germes pathogènes, elles montrent des variations plus ou moins importantes qui dépendent en premier lieu de la souche pathogène elle-même (indicateur) et de la souche lactique (cible).

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :

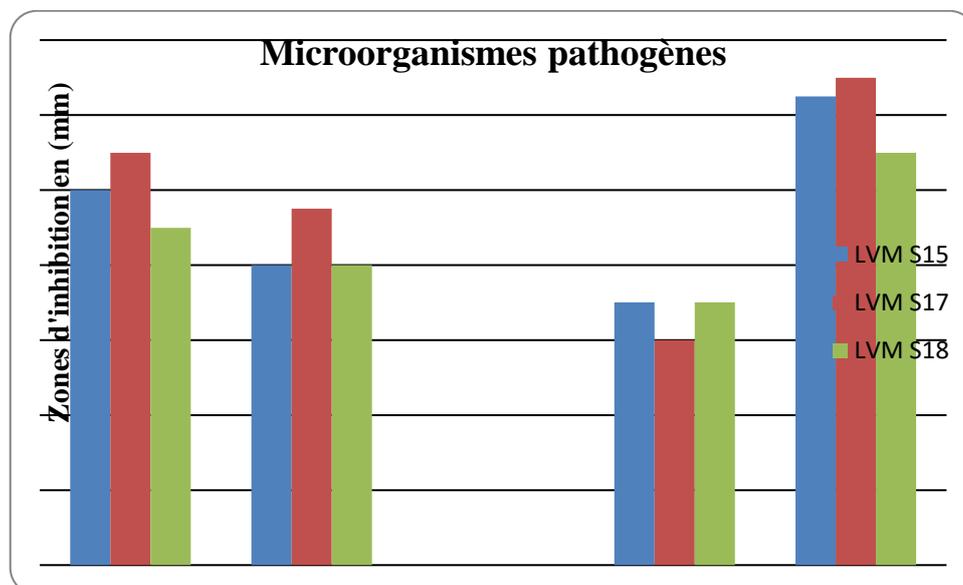


Figure 11 : Activité antimicrobienne de 3 souches lactiques vis-à-vis des germes pathogènes.

➤ *Staphylococcus aureus*

Sur la base des résultats obtenus, il s'avère que les 3 souches lactiques utilisées (LVM S15, LVM S17, LVM S18) possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire avec un diamètre entre 8mm et 9,5mm et entre 9mm et 11mm contre *Staphylococcus aureus* d'origine clinique. Ces valeurs sont inférieures à celles citées dans notre étude précédente, dans laquelle nous avons noté la présence d'une activité antibactérienne intéressante à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, avec des zones d'inhibition allant de 9mm à 19mm.

➤ *Candida albicans*

Aucune activité antifongique n'est observée à l'égard de *Candida albicans*. En effet, les 3 bactéries lactiques ne présentent aucun effet sur la croissance de ce champignon. Selon les résultats précédents, les 19 souches lactiques testées ont montré une activité antifongique importante vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231, cela est révélé par l'apparition des zones d'inhibition de 8mm à 28mm. Cette inhibition est probablement due soit à la résistance de ce germe aux composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques, soit à la conservation qui a influencé les performances de la bactérie lactique.

L'activité antagoniste est également testée sur les bactéries multirésistantes à savoir *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

➤ *Pseudomonas aeruginosa* BMR

D'après les résultats des zones d'inhibition (**Figure 11**), nous avons remarqué que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* est inhibée par les trois souches lactiques testées (LVM S15, LVM S17, LVM S18) avec une intensité de l'activité très proche. Le diamètre de zones d'inhibition varie entre 11mm et 13mm.

➤ *Klebsiella pneumoniae* BMR

Les trois souches lactiques testées ont présenté une activité inhibitrice inférieure à celle enregistrée avec *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibitions qui se situent entre 6mm et 7mm.

Par conséquent, nous avons déduit que la souche LVM S17 est plus performante que les autres souches.

D'après **Hammi (2016)**, les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les effets antagonistes qu'elles peuvent avoir. Ces inhibitions pourraient avoir plusieurs origines parmi lesquelles nous pouvons citer : la production des composés antimicrobiens comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les phages et/ou les bactériocines produits par les bactéries lactiques. Ces composés sont capables d'inhiber ou de limiter la croissance et la prolifération de certains microorganismes pathogènes.

A la lumière des résultats trouvés, nous pouvons noter que les différents composés antimicrobiens produits par les différentes souches lactiques isolées exercent :

- Un effet fortement inhibiteur de la croissance des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*).
- Un effet modéré, selon les souches vis-à-vis des espèces Gram négatif (*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*).

D'après les travaux de **Metlef et al. (2009)** ; **Onda et al. (2003)** qui confirment que les bactéries Gram positif sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques où les bactériocines produites par ces dernières agissent sur les bactéries Gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires.

Les bactéries lactiques produisent un large éventail de composés pouvant agir de manière synergique envers les levures et les champignons filamenteux (**Magnusson et al., 2003**).

Les travaux de **Cabo et al. (2002)**, ont proposé que l'activité antifongique des bactéries lactiques est due à un effet synergique entre l'acide lactique produit par les bactéries et l'acide acétique issu du milieu de culture MRS. D'après les études réalisées par **Nes et al. (2011)** ; **Schnürer et Magnusson (2005)**, les bactéries lactiques produisent des composés antifongiques notamment l'acide phénylacétique des dipeptides cycliques et des acides gras à chaîne courte ou moyenne, qui sont différents des acides organiques, ces composés sont difficiles à isoler et à caractériser à cause de leurs faibles concentrations et leurs compositions chimiques, étant des molécules actives en synergie avec une faible activité individuelle.

I.7 Détermination de profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries lactiques étudiées

L'antibiogramme est réalisé pour 20 souches de bactéries lactiques vis-à-vis de 09 antibiotiques de différentes familles, la mesure du diamètre des zones d'inhibition de chaque souche pour chacun des antibiotiques testés permet de caractériser les souches comme étant sensibles ou résistantes (**Figure 12**).

Les résultats de ce test sont représentés dans la figure 12 et les tableaux VIII et IX en annexe II.

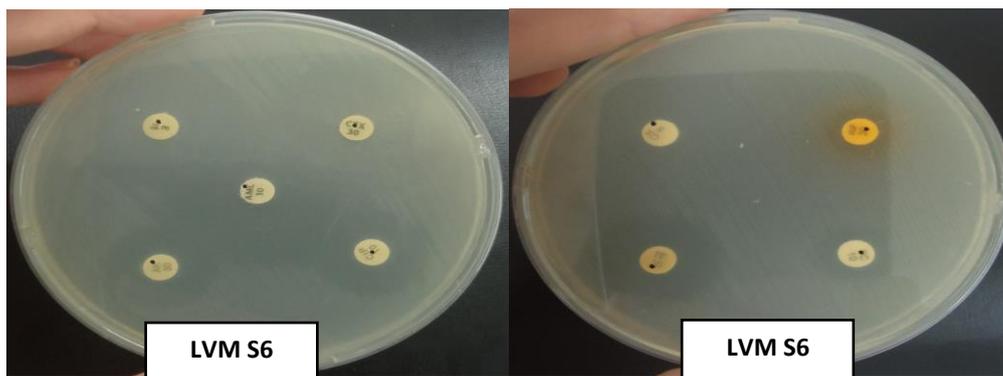


Figure 12 : Résultat du test de l'étude de la sensibilité d'une souche isolée (LMVS6) sélectionnée antagoniste aux antibiotiques.

D'après les résultats obtenus de l'antibiogramme vis-à-vis les souches lactiques isolées, nous avons constaté que :

- Toutes les souches sont sensibles à l'Amoxicilline + Acide clavulanique.
- Toutes les souches sont résistantes à l'Oxacilline, Rifampicine.
- Les souches : LVM S6, LVM S13, LVM S17, LVM S19 sont sensibles à la Tétracycline.

- La sensibilité à l'Érythromycine et Céfotaxime, est notée chez toutes les souches à part chez LVM S1, LVM S2, LVM S13, LVM S20, LVM S22. Quant aux souches suivantes : LVM S5, LVM S13, LVM S22, un phénotype intermédiaire a été noté.
- La plupart des souches sont sensibles à l'Amikacine mais elles sont résistantes pour l'Acide fusidique.

Cette résistance des souches aux antibiotiques peut être expliquée par l'utilisation massive des antibiotiques par les services vétérinaires dans cette région d'étude comme traitement préventif des vaches.

En outre, nous avons constaté que ces antibiotiques : Cefotaxime, Erythromycine et (Amoxicilline + Acide clavulanique) préservent toujours leurs efficacités.

D'après l'étude de la sensibilité par disques des *Leuconostocs* isolées de lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie, mise au point par **Kanza et al. (2011)**, nos résultats sont similaires pour la résistance totale à l'Oxacilline de 1ug, Ciprofloxacine de 5 ug (0 diamètre).

En comparant les phénotypes de résistances de ces souches d'origine alimentaire avec un travail visant à évaluer la sensibilité aux antibiotiques des *Lactobacillus* isolées du fromage Parmigiano Reggiano de **Coppola et al. (2005)**, toutes les souches étaient résistantes aux antibiotiques suivants : Oxacilline, Vancomycine, Acide nalidixique, Nitzoline, Tobramycine. Les travaux de **Swenson et al.(1990)** ; **Charteris et al. (1998)** ; **Delgado et al.(2005)** ; **Florez et al.(2005)** ; **Herreros et al. (2005)**, ont démontré une résistance à la plupart des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques, à l'Acide nalidixique et aux fluoroquinolones de Métronidazole. Ces bactéries sont également naturellement résistantes aux aminoglycosides et aux glycopeptides.

En revanche, elles sont sensibles à : la Pénicilline, la mycine primitive Ainsi, les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques (Érythromycine, Chloramphénicol) qui inhibent la synthèse des protéines (**Charteris et al., 1998** ; **Rojo-Bezares et al., 2006**).

Par ailleurs, **Benmammar (2018)** a trouvé dans l'étude de caractérisation phénotypique et moléculaire des souches des bactéries lactiques productrices de bactériocines isolées du lait maternel, une résistance totale de 100% à l'Oxacilline, Vancomycine, Acide nalidixique, Nitroxoline, Tobramycine. Mais, aucune résistance n'est notée chez les antibiotiques suivants : Pénicilline, la Pristinamycine, Erythromycine, Chloramphénicol. Ce qui correspond parfaitement avec les résultats que nous avons obtenus.

Par contre **Mikelsaar et al. (2004)**, ont trouvé des résultats en contradiction avec les nôtres : ils ont rapporté que des souches de *Lactobacillus* étudiées ont présenté une résistance de 100% à l'Amikacine et à la Gentamicine.

Conclusion

L'un des intérêts de recherche sur les bactéries lactiques est de développer une stratégie permettant de limiter la croissance des germes indésirables, par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques qui sont capables d'assurer une qualité hygiénique et bio préservation inhibant ainsi les germes nuisibles dans les produits alimentaires. Ces bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites ayant des propriétés antagonistes telles que les bactériocines.

La présente étude a été conduite dans le but d'isoler, purifier, identifier et tester les propriétés antibactériennes de la population lactique présente dans le lait de vache provenant de la wilaya de Blida.

Sur la base de la coloration de Gram et le test de la catalase, 30 isolats sur milieu MRS et M17 ont été sélectionnés et identifiés comme des bactéries lactiques.

Après les différents tests conduits sur les souches de bactéries lactiques de notre collection, nous avons remarqué qu'il existe des bactéries plus résistantes aux antibiotiques telles que : LVM S22, LVM S5. La souche la plus sensible d'entre elles est : LVM S19.

En ce qui concerne la deuxième expérience que nous avons menée pour étudier l'effet antagoniste de 20 souches de bactéries lactiques isolées sur le milieu MRS (LVM S1 jusqu'à LVM S22, à l'exception de LVM S5 et LVM S12) sur les 5 souches pathogènes d'origine alimentaire et médicale (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* BMR et *Klebsiella pneumoniae* BMR) et 3 souches ATCC (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* et *Candida albicans*).

Les résultats de cette étude ont montré que toutes les souches lactiques ont un pouvoir inhibiteur dirigé contre toutes les souches pathogènes et les ATCC, à l'exception des souches : LVM S15, LVM S17 et LVM S18 qui n'avait aucun effet sur *Candida albicans*. La plus forte activité bactéricide est observée avec la souche LVM S1 vis-à-vis *Candida albicans* ATCC, avec un diamètre de 28mm. Cette activité est probablement due à la synthèse de substances inhibitrices tels que les acides organiques principalement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et à l'excrétion de bactériocines, connues par leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique contre de nombreux microorganismes pathogènes.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les souches

lactiques pourraient être utilisées comme alternatives pour inhiber les bactéries d'altération à Gram négatif et positif ainsi que les bactéries multirésistantes.

En perspective, des études approfondies doivent compléter ce travail tels que :

- Application de la bioinformatique pour l'identification des souches lactiques.
- La recherche de gènes de résistances plasmidiques et chromosomiques.
- Purification de la bactériocine par méthodes chromatographiques telles que HPLC, FPLC.
- Comprendre le mécanisme du pouvoir bactéricide/bactériostatique des souches lactiques isolées sur les bactéries pathogènes et multirésistantes.

Références bibliographiques

A

Adil ; Banday K ; Ahmad Bhat. G et Shanaz. S (2011). Response of broiler chicken to dietary supplementation of organic acids. *J.cent.Euro. Ogri.* 12,498-508.

Ammor. M.S ; Flo´rez. A.B ; Mayo. B (2006). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria .Instituto de Productos Lácteos d’Asturias (CSIC), 559–570.

Allassane. H (2001). Sensibilité et évolution de la résistance des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques à l’hôpital national de Niamey. Thèse de doctorat en Pharmacie, Bamako.

B

Badis. A ; D. Guetarni. B ; Moussa-Boudjema. D.E ; Henni and Kihal. M(2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goats milk of furnace Algerian races. *Food Microbiol.*, 21(5): 579-588.

Badis. A ; Laouabdia. S ; 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*, 23, 30-37.

Bahri. F (2014). Isolement et caractérisation des souches de Lactobacilles à caractères probiotiques à partir des selles d’enfants. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Université de Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie.

Bekhouche. F ; Boulahrouf. A (2005). Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d’élevage de Constantine. *Sciences & Technologie C (23)* :38-45.

Bekhouche. F (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Évaluation et optimisation de la production d’enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat en Génie alimentaire non publiée, Université de Constantine, Constantine.

Belhamra Z. (2017). Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. Thèse de doctorat : Microbiologie, Université Ferhat Abbas Sétif, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Benabbou. T.A (2012). Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux algériens. Mémoire de magister. Université d’Oran.

Bergey’s Manual. (2009). Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the Firmicutes. Edition Springer.

Bernadaud. M ; Guguen. M ; Vernoux. J.P (2006). Beneficial *Lactobacilli* in food and feed : long term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiology Reviews 30, 487-513.

Biquand. A (2017). Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* et leurs traitements en 2017. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Bretagne Loire.

Brahimi. S(2015). Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolée à partir des margines d'olives « AMOREDJ » fermentés. Thèse magister Biodiversité des micro-organismes non publiée, Université d'Oran, Oran.

Bouchet. P ; Guignard. J.L ; Madulo-leblond. G and Regli. P (1989) Mycologie générale et médicale. Ed Masson. Paris ; 107-20

Bouguerra. A (2022). Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Bulgasem. Y ; Lani. M.N ; Hassan. Z ; Yusoff. W.F ; Fnaish. S.G (2018). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Natural Honey against Pathogenic *Candida* Species. The Korean Society of Mycobiology.

C

Cabo M L, Braber A F, Koenraad P M F J. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. Journal of Food Protection. 65, (8) :1309-1316.

Charteris. W.P ; Kelly. P.M ; Morelli. L ; Collins. J.K 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. Food. Prot. 61:1636-1643.

Chikhani. N.K (2012). *Klebsiella pneumoniae* pathogène nosocomial résistance et virulence. Thèse de doctorat : Microbiologie, Université Pierre et Marie Curie Paris 6.

Chu. W.S ; Magee. B.B and Magee. P.T(1993). Construction of an Sfil macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. J Bacteriol. 175 : 6637-6651.

Comité De L'antibiogramme De La Société Française de Microbiologie, Recommandations 2013.

Coppola. R ; Succ M ; Tremonte. P ; Reale A ; Salzano. G ; Sorrentino. E(2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacllus rhamonosus* strains from Parmigiano Reggiano cheese. Lait. 85: 193-204.

D

Daffe. F.M (2018). Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Klebsiella pneumoniae* au Laboratoire Rodolphe Merieux de 2016 à 2017. Thèse de doctorat : Pharmacie, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako.

David. J (2009). Attribution des cas de salmonelloses humaines aux différentes filières de production animale en France. Thèse de doctorat : Biologie et Agronomie, Université Européenne de Bretagne, Ecole doctorale : Vie Agro Santé.

Delavenne. E(2012). Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus. Thèse de doctorat : Microbiologie, Université de Bretagne Occidentale.

Delgado. S ; Flo´rez. A.B ; Mayo. B (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr.Microbiol.* 50, 202–207

Dembélé. T ; Obdrzalek. V ; Votava. M (1998). Inhibition of Bacterial Pathogens by *Lactobacilli*. *Zentralblatt fur Bakteriologie.* 288,395-401

Desmazeaud. M (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait* 63, 267-316.

Djadouni. F ; Kihal. M (2013) Characterization and determination of the factors affecting anti-listerial bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy milk products. *African Journal of Food Science* Vol. 7(2). 35-44.

Dongyou. L (2015). Enterotoxin producing *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology* , 2nd edition, volume 2, pages 979-995.

Dortu. C and Thonart. P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (1), pp 143-154.

F

Fangous. M (2019). Nouvelle thérapeutique anti-*Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose : Les *Lactobacillus spp.* Thèse de doctorat en Microbiologie, Virologie et parasitologie. Université de Bretagne Occidentale.

Fay. K (2005). Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques: impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine. *Antibiotiques* 7, 45-52

Fleming. H.P ; Erchells. J.L and Caslilow. R.N (1975).Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bunc. *Applied Environ.*30: 1040-1042.

Flo´rez, A.B ; Delgado. S ; Mayo. B (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can. J.Microbiol.* 51, 51–58

G

Graser. Y ; Volovsek. M ; Arrington. J ; Schonian, G ; Presber, W ; Mitchell. T.G and Vilgalys. R. Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Nall Acad Sci U.S.A* (1996). 93 : 12473-12477.

Gessard C. Classics in infectious disease. On the blue and green coloration that appears on bandage. By Carle Gessard (1850-1925). *Revue Infect Dis.* 1984 Sep-Oct ; -6 Suppl 3: S775-66

Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris.

Guiraud J.P. (2003). Microorganismes intervenant dans l'industrie alimentaire, microbiologie alimentaires application à l'étude des principaux groupes microbiens.

H

Hammi. I(2016). Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocaines et de différentes variétés de fromage français. Thèse de doctorat en chimie analytique non publiée, Université de Strasbourg, Strasbourg.

Herrero. M ; Mayo. B ; González. B ; Suàrez, J.E (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 565–570

Heyman, M., Heuvelin, E. (2006). Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : 85–9.

Hogg. S (2005). Essential Microbiology. Library of Congress Cataloguing-in-Publication Data British Library Cataloguing in Publication Data.

J

Jerome, J. P., James, T. S., Stephen, L. (2004). Microbiologie. Ed. Dunod. Paris.P 479.

K

Karam N.F., Dellali A et Karam Z.H.Activité lipolytique chez les bactéries lactiques. 19èmes rencontres autour des recherches sur les ruminants, 2012 Déc 05.Institut de l'élevage, Paris.

L

Lagane.C (2007). Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de PPAR- γ . Thèse de doctorat en Immunopathologie, Oncogenèse et Signalisation Cellulaire. Université Toulouse III.

Laurence. L ; Christine. V (2013). Laits animaux et végétaux .eyrolles, 12-29

M

Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 219 (1): 129-135.

Mami. A ; Henni. J.E ; Kihal. M (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian Raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University, BP 16, Es-senia, 31100, Oran, Algeria.

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

Mami A.(2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie, Thèse : Microbiologie appliquée, université d'Oran, Algérie.

Mammeche, A. (2008). Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées. Thèse doctorat science alimentaires non publiée, Université d'Alger, Alger.

Metlef. S ; Dilmi-Bouras. A (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Revue Nature et Technologie. n° 01/Juin 2009. Pages 33 à 44.

Muylaet. A ; MAINIL. J.G.(2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes et leur « contagiosité ». Service de Bactériologie, Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, 156, 109-123.

N

Nes I F, Kjos M, Diep D B (2011). Antimicrobial components of lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4th ed. CRC Press, London, p. 285-329.

Naaber. P ; Smidt. I ; Štšepetova. J ; Brilene. T ; Annuk. H ; Mikelsaar. M (2004).Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. *Journal of medical microbiology* 53 (6), 551-554.

O

Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K. (2003). Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *International Journal of Food and Microbiology*.87 (1-2): 153-159.

P

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., Angelis, M. De, Gobbetti, M., Kleerebezem, M.,Kok, J. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 837–890.

S

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H. et Kihel M. 2002. Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Algérie. Rég. Arides*. 1 :1-11.

Saffiedine B. (2019). Contribution à l'étude du système BAC « Biofilm Associated Cluster » chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat en Chimie. Université de Rouen Normandie.

Sakoui. S ; Derdak. R ; Addoum. B ; Pop. O.L ; Vodnar. D.C ; Suharoschi. R ; Soukri. A El Khalfi. B (2022).The first study of probiotic properties and biological activities of lactic acid bacteria isolated from Bat guano from Er-rachidia, Morocco. *Food Science and Technology* 159 (2022) 113224.

Schnürer J, Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*. 16 (1): 70-78

Singleton P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.

Swenson. J.M ; Facklam. R.R ; Thornsberry. C (1990). Antimicrobial Susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34,543–549

T

Tahlaiti. H (2019). Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Domaine : S.N.V.

Tailliez. P (2001). Mini-revue, les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. Le lait 81, 1-11.

Tapernoux. A(1937). La production d'un lait propre et sain à la ferme. Le Lait pp.241-259.

Tracey. A ; Chandrashekhar. G (2022).*Staphylococcus aureus* infection. National Library of Medicine.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique. Canada.945p.

V

Vandamme, P., De Bruyne, K., Pot, B. (2014). Phylogenetics and systematics. In: Holzappel, W.H., Wood, B.J.B. (Eds). Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom. pp. 31–44

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

Z

Zergoug A. (2017). Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. Thèse de doctorat : Microbiologie Appliquée, Université Abdelhamid Benbadis, Mostaganem.

Zarour. K ; Benmechernene. Z ; Hadjadji. M ; Boudjemaa. B.M ; Henni. J.M et Kihal. M (2011).Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie.Laboratoire de microbiologie appliquée, département de biologie, faculté des sciences, université d'Oran, Bp16. Es-Senia, 31100, Oran Algérie.Nature & Technologie.p45-47.

Annexes

Annexe I

- **Matériel non biologique**

Milieux de culture et bouillons	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) • Gélose M17 • Gélose Mueller Hinton (MH) • Gélose semi-solide TSA • Gélose nutritif (GN) • Gélose Hektoen (HK) • Gélose Chapman • Gélose Sabouraud + Chloramphénicol • Bouillon BHIB • Bouillon M17 • Bouillon MRS • Bouillon TSB
Réactifs utilisés dans la galerie API 20E	VP1, VP2, KOVACS, TDA.
Réactifs utilisés dans l'identification	Fuchsine, violet de gentiane, lugol, éthanol absolu, eau oxygénée.
Solutions et disques imprégnés	Eau physiologique, l'huile à immersion, l'huile de vaseline, disques d'antibiotiques.

Appareillage	<ul style="list-style-type: none"> • Etuve à 37°C et 42°C • Autoclave • Sécheuse • Microscope optique • Bain marie • Plaque chauffante • Balance
Verrerie	<ul style="list-style-type: none"> • Fiolle • Flacons en verre stériles • Pipettes pasteur stériles • Tubes à essai stériles • Lames et lamelles • Eprouvette
Autres matériel	<ul style="list-style-type: none"> • Boîtes de pétri • Pied à coulisse • Pince métallique • Micropipettes 1000 µl ; 100 µl ; 5µL • Emboutes bleus, jaunes



Annexe II

- **Résultats**

1. *Candida albicans*

1.1 Test de Blastèse

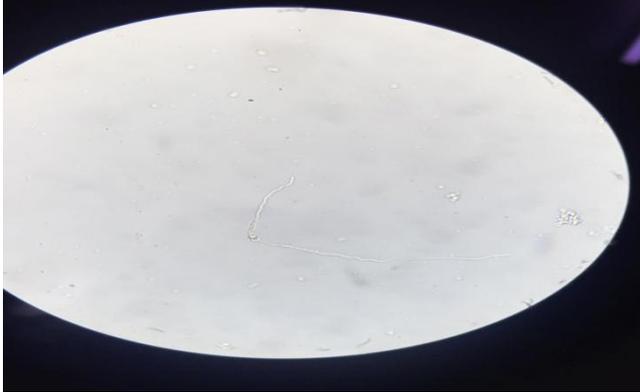


Figure 14 : Observation des tubes germinatifs après le test de blastèse (Photo originale, 2023)

2. *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et clinique

2.1 Examen macroscopique



Figure 15: Examen macroscopique de *Staphylococcus aureus* (Photo originale, 2023)

2.2 Test de la coagulase

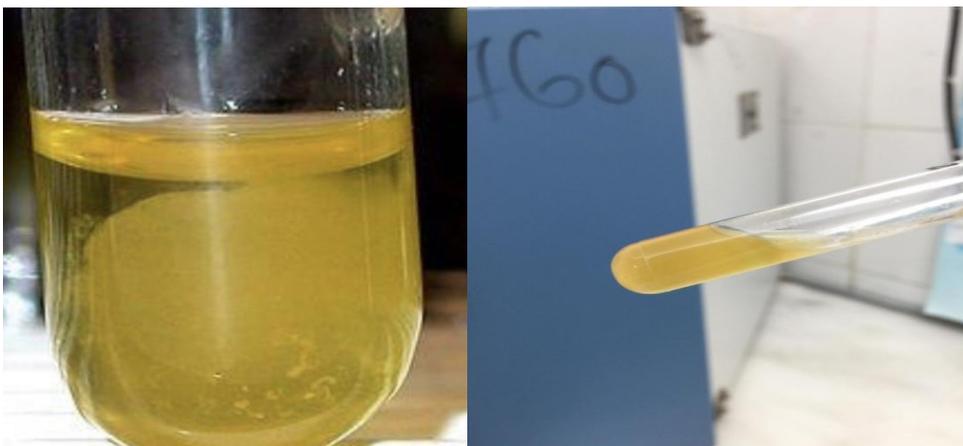


Figure 16: Test de coagulase positif pour les deux souches de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et médicale (Photo originale, 2023)

3. Bactéries multirésistantes (*Pseudomonas aeruginosa* / *Klebsiella pneumoniae*)

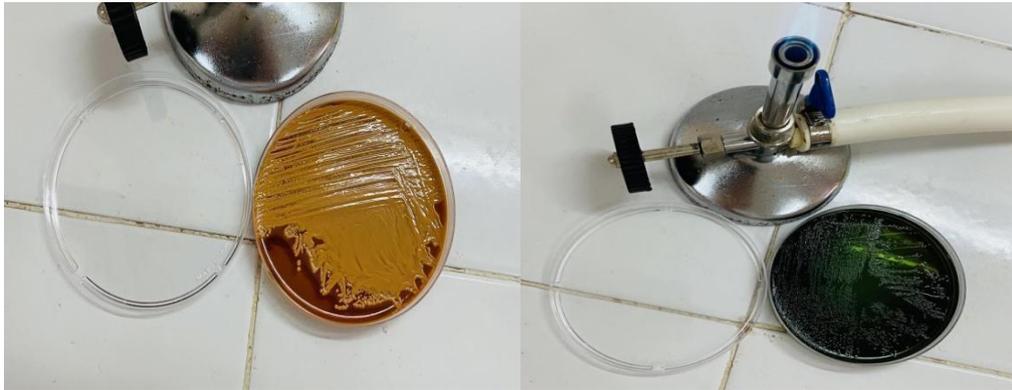


Figure 17: Examen macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (Photo originale, 2023)

3.2 Galerie API 20E pour les bactéries multirésistantes



Figure 18 : API 20 E de *Pseudomonas aeruginosa* BMR (Photo originale, 2023)

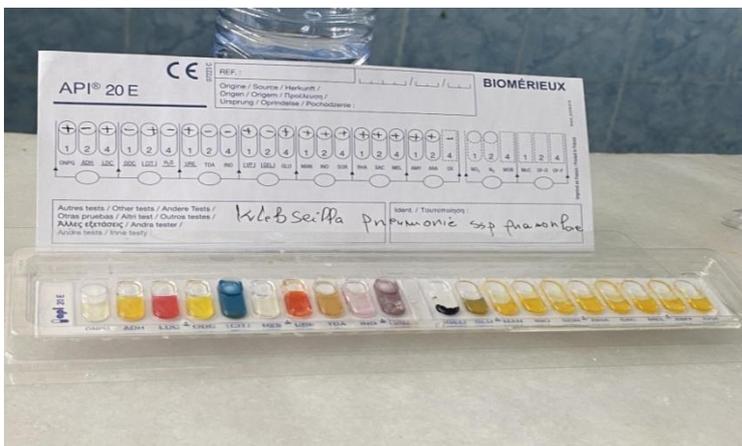


Figure 19: API 20 E de *Klebsiella pneumoniae* BMR (Photo originale, 2023)

Tableau : Lecture de la galerie API20E

Nom du Micro-tube	caractère recherché	substrat(s) présent(s) dans le microtube	révélateurs présents	réactif(s) à rajouter éventuellement	aspect caractère +	aspect caractère -
ONPG	β-galactosidase	ONPG, β-thiogalactosidase			Jaune	inclore
ADH LDC ODC	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Peptone de levure Pyridoxal phosphate Acide aminé correspondant Glucose ???? Rouge de phénol pH initial acide	Rouge de phénol	-	rouge (orange pour LDC en 24 h)	jaune à orangé (sauf LDC 24 h)
CIT	Utilisation du citrate comme seule source de carbone	Citrate de sodium Bleu de Bromothymol (BBT)	Bleu de Bromothymol (BBT)	-	bleu en surface	vert-jaune
H ₂ S	Production d'H ₂ S à partir de thiosulfate	peptone thiosulfate de sodium fer III	fer III	-	précipité noir	pas de précipité noir
URÉ	Uréase	Urée Rouge de phénol	Rouge de phénol	-	rouge	jaune
TDA	Tryptophane désaminase	Tryptophane		chlorure de fer III	marron	jaune
IND	Production d'indole	Tryptophane		James ou Kovacs	rouge	jaune
VP	Production de butan-dione, 3-hydroxybutanone ou 2,3-dihydroxybutane	peptone pyruvate	napht-1-ol KOH	napht-1-ol KOH	rose	incolore
GÉL	Gélatinase	gélatine agglomérée avec du carbone	carbone		noir	pas de diffusor du carbone noir
GLU MAN INO SOR RHA SAC MÉL AMY ARA	Utilisation des glucides ou dérivés correspondants (glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amygdaline, arabinose)	peptone glucide correspondant Bleu de Bromothymol (BBT) Dans le tube Glucose sont ajoutés des nitrates)	Bleu de Bromothymol (BBT)	-	jaune	bleu
NO ₂	Réduction des nitrates en nitrites dans la cupule GLU	utilisation du tube Glu	-	1-naphtylamine et acide sulfanilique	rouge	jaune
N ₂	Réduction des nitrates en diazote dans la cupule GLU	utilisation du tube Glu après lecture NO ₂		Si NO ₂ – alors poudre de zinc	jaune	rouge

3.3 Antibiogramme

- Des souches lactiques

Tableau VIII : Résultat de l'antibiogramme des souches lactiques du 1^{er} prélèvement.

Les souches	Charge en µg	Symbole	LVM S1	LVMS 2	LVM S3	LVM S4	LVM S5	LVM S6	LVM S7	LVM S8	LVM S9	LVM S10
			Les antibiotiques									
Amoxicilline + A.clavulanique	30	AMC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycine	15	E	R	R	S	R	I	S	S	S	S	S
Cefotaxime	30	CTX	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S
Ciprofloxacine	10	CIP	S	R	S	R	R	I	S	S	S	S
Oxacilline	10	OX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicine	30	RIF	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R
Amikacine	30	AK	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
Acide fusidique	10	FC	S	S	S	S	R	R	I	S	I	I
Tetracycline	30	TE	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R

Tableau X : Résultat de l'antibiogramme des souches lactiques du 2^{ème} prélèvement.

Les Souches	Charge	Symbole	LVM S11	LVM S12	LVM S13	LVM S14	LVM S15	LVM S16	LVM S17	LVM S18	LVM S19	LVM S20	LVM S21	LVM S22
			Les antibiotiques											
Amoxicilline + acide clavulanique	30	AMC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycine	15	E	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	I
Ciprofloxacine	30	CIP	I	I	I	S	S	R	R	S	S	S	S	I
Amikacine	10	AK	R	R	I	I	S	S	R	R	S	S	-	R
Cefotaxime	10	CTX	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
Rifampicine	30	RIF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
Acide fusidique	30	FC	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R
Oxacilline	10	OX	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	-	R
Tetracycline	30	TE	R	R	S	R	R	I	S	R	S	R	R	R

- **Des bactéries multirésistantes**

Tableau XI : Résultat de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	Kp
Amoxicilline	AMX	25	R
Amoxicilline+A.clavulanique	AMC	30	R
Ampicilline	AMP	10	R
Cefazoline	CZ	30	R
Aztreonam	ATM	30	R

Imipeneme	IMP	10	S
Rifampicine	RIF	30	R
Gentamicine	CN	10	R
Cotrimoxazole	COT	25	R
Ciprofloxacine	CIP	30	S
Chloramphénicol	C	30	R
Colistine	CL	10	R

Kb: *Klebsiella pneumonia*

Tableau XII : Résultat de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	Ps
Piperacilline	PRL	100	S
Aztreonam	ATM	30	S
Cefotaxime	CTX	30	R
Tétracycline	TC	75	S
Tétracycline+A.clavulanique	TIM	85	S
Imipeneme	IMP	10	S
Amikacine	AK	30	S
Gentamicine	CN	10	S
Tobramycine	TOB	10	R
Ciprofloxacine	CIP	30	S
Chloramphénicol	C	30	R
Cotrimoxazole	COT	25	R

Ps : *Pseudomonas aeruginosa*

Annexe III

❖ **Composition du milieu de culture MRS :**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levures.....	5g
Glucose.....	20g
Tween80.....	1 ml
Phosphate di potassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de magnésie.....	0,05 g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1L

Autoclaver à 120°C/20mn

❖ **Composition du milieu de culture M17 :**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	5g
Extrait de levures.....	2,5g
Glycérophosphate de Sodium.....	12g
Sulfate de magnésium.....	0,25 g
Acide ascorbique.....	0,5 g
Agar-Agar.....	15g
Glucose.....	0,5 g
Eau distillée.....	1L

Autoclaver à 120°C/20mn