



**République Algérienne Démocratique et
Populaire**



**Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche
Scientifique**

**Université de Saida Dr. Moulay Tahar
Faculté des Sciences Département
Biologie**

Projet de fin d'étude pour l'obtention du diplôme Master en Microbiologie

Spécialité

Microbiologie

Thème

**Antibiorésistance chez les bactéries lactiques
étude microbiologique et génétique**

Encadré par :

M^{me} . Amara Sabrina

Présenté par :

BOUAKKA Aicha
MOKADEM Zouaouia

Devant le jury composé de :

Présidente

M^{me} Dahani Moufida

Examineur

MR Ammam Abdelkader

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

Je remercie en premier lieu le Créateur des cieux et des terres, notre Grand Dieu Tout Puissant qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'affronter les difficultés rencontrées et aboutir à la réalisation de ce travail.

Je dois l'aboutissement de cette thèse à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de Mémoire Mme Amara Sabrina et d, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour nous permis de travailler sur un projet où nous avons pu me familiariser avec différentes techniques de microbiologie. Et delà de sa compréhension, j'ai beaucoup apprécié la confiance qu'elle vous nous avez toujours accordée, et grâce à laquelle nous vous bénéficié d'une grande liberté dans notre travail.

Nous sommes particulièrement reconnaissantes à Mme Dahani Moufida d'avoir accepté de juger ce travail en tant que présidente ainsi que, Mr Ammam Abdelkader, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire. Et tous les enseignants de département des sciences de la nature et de la vie.

Nous plus sincères Gratitude à le directeur de laboratoire appliquée Hemad Ahmed et Slamet pour nous avoir accueillis au sein de son laboratoire et nous avoir données les moyens de mener à bout cette étude.

Nos très précieux remerciements reviennent à nos familles et nos amies pour leurs encouragements.

Finalement, nous remercierons tout ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

Au pur esprit de mon cher père et ma chère mère

*Pour leur éducation, leur patience, leur soutien et leurs efforts
de l'enfance jusqu'à ce moments*

A mes frères et mes sœurs et leurs fils et filles.

Bouakka Aicha

Dédicace

Louanges à Allah, seigneur de L'univers ; que la salutation d'Allah soient sur son messager qu'il a envoyé en qualité de miséricorde universelle, ainsi que sur ses compagnons et ses frères jusqu'à la résurrection.

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de ma très chère mon père, qui a veillé sur mon éducation, que dieu L'accueille dans son vaste Paradis.

A ma mère qui ma encourager durant tous mon cursus universitaire, je souhaite qu'il soit heureuse pour tout le reste de sa vie.

A mon cher frère Rachid (Mohamed). Qui dieu te garde pour moi.

A mon binôme Bouakka Aicha, mes sincères remerciements et ma gratitude de m'avoir soutenu dans nos travaux.

A toute ma famille plus élargie.

*A tous les professeurs les enseignants qui ont contribué à ma formation qui sont-ils :
Mr Benreguiég Mokhtar, Mr zouidi Mohamed et autres.*

A toutes les amis proche : chaïbe Romeissa, Mouedden Amel...

Enfin, Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier par le directeur de laboratoire appliquée Hemad Ahmed, qui nous a donné tout le soutien et motivation et à tous les promotions microbiologies.

Mokadem. Zouaouia

ملخص :

في هذه الدراسة تمنا باختبار مقاومة بعض سلالات البروبيوتيك ضد بعض السلالات المسببة للأمراض. حيث أجريت التجارب على 07 سلالات من العصيات اللبنية؛ وذلك بإجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على 25 نوع من المضادات. ثم تمنا باختبار السلالات السبعة من حيث مقاومتها للظروف المعوية وكذا مقاومتها لحموضة وأملاح العصارة الصفراوية؛ وكذلك تمنا باختبار الزشاط المضاد للميكروبات ضد 06 سلالات من البكتيريا المسببة للأمراض؛ وفي الأخير السلالات المنتقاة تم التعرف عليها عن طريق تحليل الجينة ARNr 16S. أظهرت السلالات المختبرة مقاومة كبيرة تجاه بيثا الكتام وامينوغليكوزيد، كما أن ظاهرة نضاد العصيات اللبنية للسلالات المسببة للأمراض ظهرت منبأية وبصورة مختلطة وأكددت النتائج أن سلالات *Lactobacillus brevis* CHTD27 و *Lactobacillus plantarum* NSC5C هي الأكثر مقاومة لحموضة وأملاح العصارة الصفراوية. وأكددت نتائج اختبار التعرف على أن السلالات المنتقاة تنتمي إلى *Lactobacillus plantarum* taxon بنسبة تفوق 90%. **الكلمات الرئيسية:** بكتيريا حمض اللبنيك ، المضادات الحيوية ، المقاومة ، البكتيريا المسببة للأمراض ، البروبيوتيك.

Résumé :

Au cours de cette étude, nous avons testé la résistance de certaines souches de bactéries probiotiques aux antibiotiques ainsi que leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de quelques souches pathogènes.

Les tests ont été conduits sur 7 souches de lactobacilles, l'antibiogramme a été réalisé sur 25 antibiotiques. Nous avons ensuite testé nos sept souches aux conditions intestinales hostiles telles que la résistance à l'acidité et aux sels biliaries pour la sélection de souches probiotiques, l'activité antimicrobienne contre 06 souches de bactéries pathogènes cellulaire et extra cellulaire a également été recherchée et enfin les souches sélectionnées ont été identifiées par séquençage du gène ARNr 16S.

Les souches lactiques ont montré une grande résistance béta lactamine et aminoside, l'effet antagoniste des lactobacilles sur les souches pathogène était assez mitigé. Les souches *Lactobacillus brevis* CHTD27 et *Lactobacillus plantarum* NSC5C étaient les plus résistantes à l'acidité et aux sels biliaries.

Les résultats des identifications ont confirmé que les souches sélectionnées appartiennent au taxon *Lactobacillus plantarum* à plus de 90%.

Mots clés : résistance, probiotiques, antibiotiques, bactéries pathogènes, lactobacilles.

Abstract:

In this study, we tested the resistance of certain strains of probiotic bacteria to antibiotics and their inhibitory power against some pathogenic strains.

The tests were conducted on 7 strains of lactobacilli; the antibiogram was performed on 25 antibiotics. We then tested our seven strains for hostile intestinal conditions such as resistance to acidity and bile salts for the selection of probiotic strains, antimicrobial activity against 06 strains of pathogenic bacteria cell and extracellular was also sought, finally selected strains were identified by sequencing the 16S rRNA gene.

Lactic strains showed high resistance to beta-lactam and aminoglycoside, the antagonistic effect of lactobacilli on pathogenic strains was rather mixed. *Lactobacillus brevis* CHTD27 and *Lactobacillus plantarum* NSC5C strains were the most resistant to acidity and bile salts.

The results of identifications confirmed that the selected strains belong to *Lactobacillus plantarum* taxon at more than 90%.

Key words: resistance, probiotics, antibiotics, pathogenic bacteria, lactobacilli.

Sommaire :

Abréviations	1
Liste des figures	2
Liste des tableaux	3
Introduction	4, 5

Chapitre I : Bactéries lactique

Définition	6
Description générale	6, 7
Genre <i>Lactobacillus</i>	7
Rôle des lactobacilles dans l'industrie agro-alimentaire	7
Les fonctions du ferment	8
Lactobacillus comme ferment dans l'industrie agro-alimentaire	8, 9
Lactobacillus comme agent contaminant dans les aliments	9
Bactériocines	9
Bactériocines de <i>Lactobacillus plantarum</i>	9
Effets des lactobacilles sur la santé	10
Effets Probiotiques	10
Action nuisible des lactobacilles sur la santé	11, 12
Aspects relatifs à la sécurité sanitaire	12, 13

Chapitre II : les antibiotiques

Définitions	14
L'origine	14
La nature chimique	14
Classification des antibiotiques	14
Mode d'action des antibiotiques	14, 15
II5.1. La paroi bactérienne	15
La membrane cellulaire	15

L'ADN	15
-------	----

Le ribosome bactérien_____	15, 16
L'antibiorésistance_____	16
	Définition_ 16, 17
L'antibiorésistance chez les bactéries lactiques_____	17
Génétique de l'antibiorésistance chez les bactéries lactiques_____	17, 18
Type de résistance _____	19
Résistance naturelle ou intrinsèque_____	19
Résistance acquise_____	19, 20, 21
La résistance croisée_____	21
La co-résistance _____	21, 22
Spectre d'activité_____	22
Antibiogramme_____	22

Chapitre III : Matériel et Méthode

Souche bactérienne_____	23
Milieu de culture_____	24
Purification des souches lactiques_____	24
observation macroscopique_____	24
observation microscopique_____	24
Test de la catalase_____	24
Etude le type de fermentation_____	25
Conservation des souches_____	25
Test de pro biotique_____	25
Recherche de la résistante à l'acidité_____	25
Recherche du résistant aux sels biliaires_____	25
antibiogramme_____	26
III.6.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques en milieu liquide_____	26, 27
Etude de l'activité antimicrobienne_____	27
La méthode directe_____	27
La méthode indirecte_____	27, 28

Identification moléculaire	28
----------------------------	----

Chapitre IV : résultats et discussion

Identification des lactobacilles	29
Etude des caractères morphologiques	29
L'aspect macro et microscopique	29, 30
test de catalase	30
Test fermentaire	31
Croissance des bactéries lactiques en milieu acide	32, 33
Croissance des bactéries lactiques en présence sels biliaires	33, 34
Détermination des profils de résistance des antibiotiques	34
Résistance aux antibiotiques chez les bactéries lactiques	34, 35, 36, 37
Résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogène	37, 38, 39
Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques	39, 40
Mise en évidence de l'activité antibactérienne	40
Test des spots	40, 41
La méthode des puits	42, 43
Identification moléculaire	43, 44
Conclusion et perspective	45
Annexe	45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53
Bibliographie	54, 55, 56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CMI : concentration minimal inhibitrice	ATB : Antibiotique
MRS : de Man-Rogosa ET Sharp	mg : milligramme
Lb : <i>Lactobacillus</i>	% : pour cent
G+C : guanine+ cytosine	ADN : Acide DéoxyriboNucléique
ARN : Acide Ribonucléique	ADNr : ADN ribosomal
nm : nanomètre	E.coli : <i>Escherichia coli</i>
ml : milli-litre	µg : microgramme
°C : Degré celsius	PCR : Polymerase Chain Reaction
g : gramme	h : <i>heurs</i>
µl : microlitre	LB : Luria broth
pH : potentiel Hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes en solution (mesure l'acidité ou la basicité d'une solution chimique).	
Rpm : En anglais "Reps Per Minute", en français tour par minute (tr/min) : est une unité pour mesurer de la vitesse de rotation (généralement pour les moteurs).	

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

- **Figure 1** : Mode d'action des probiotiques. Réalisé à partir (FAO/OMS, 2001 ; Gross et al, 2010 ; Dicks et Botes, 2010)_____ 11
- **Figure 2** : Mode d'action des antibiotiques _____ 16
- **Figure 3** : Diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques _____ 21
- **Figure 4** : Aspect des colonies de *Lactobacillus* (NSCA, JUM4 et NSC5C) sur le milieu MRS _____ 29
- **Figure 5** : Aspect microscopique des souches *NSC10* et *CHDT27* (X100) _ 30
- **Figure 6** : Résultats du test de catalase _____ 30
- **Figure 7** : Test de fermentation des 7 souches de *Lactobacillus* _____ 32
- **Figure 8** : Résultats de l'antibiogramme de quelques souches de *Lactobacillus* _____ 34
- **Figure 9** : Résultats des antibiogrammes de quelques souches pathogènes _ 39
- **Figure 10** : Résultat détermination de la CMI de souche de *Lb* par méthode de dilution en milieu liquide _____ 40
- **Figure 11** : Résultats d'inhibition des bactéries pathogènes (SA4 et SA2) par les bactéries lactiques _____ 43
- **Figure 12** : Résultat de L'arbre phylogénétique des trois lactobacilles identifiés _____ 44

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX :

- **Tableau 1** : Quelques résistances naturelles rencontrées chez les bactéries lactiques _____ 18
- **Tableau02** : Souches et leurs origines _____ 23
- **Tableau 3** : Les différents disques d'antibiotique utilisé _____ 27
- **Tableau 4** : Résultat de l'étude de pouvoir fermentaire des souches de lactobacilles _____ 31
- **Tableau 5** : Résultat de la croissance de bactérie lactique en milieu Acid ___ 32
- **Tableau 6** : Croissance des bactéries lactiques en présence sels biliaries (DO600 nm) _____ 33
- **Tableau 7** : Résultats de l'antibiogramme des souches de lactobacilles _ 35, 36
- **Tableau 8** : Résultat de l'antibiogramme des Souche pathogène _____ 38
- **Tableau9** : résultat des interactions bactériennes _____ 40, 41
- **Tableau 10** : résultat de la recherche sur la nature de l'agent inhibiteur 42
- **Tableau 11** : Pourcentages d'identification des souches sélectionnées à l'aide de méthodes moléculaires et biochimiques _____ 44

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis la découverte humaine d'antibiotiques «pénicilline» par **Alexander Fleming (1928)**, ces molécules ont été largement utilisées de manière adaptative en fonction de leurs spécificités et de leur impact direct sur les microorganismes.

Les antibiotiques sont appliqués en pratique aux patients atteints de maladies infectieuses (humains ou animaux). Bien que les résultats obtenus dans les traitements antimicrobiens utilisant des antibiotiques aient grandement fait leurs preuves leur effet est encore limité chez certaines bactéries en raison de leur résistance aux antibiotiques.

Les bactéries de l'acide lactique sont des microorganismes présents partout dans certains aliments tels que le lait, les produits laitiers, la viande, les fruits et les légumes. Ils font également partie des bactéries intestinales des humaines et des animaux (**Trias, 2008 ; Leroi, 2010**).

Récemment, l'utilisation de bactéries lactiques ayant des effets biochimiques et pharmaceutiques dans le monde a suscité un grand intérêt (**Wunwissa et al., 2003**). Des scientifiques ont découvert des espèces de bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ... parmi ces espèces nous avons sélectionné les lactobacilles pour la réalisation de notre travail.

Les probiotiques bénéfiques sont des microorganismes non pathogènes, sans gènes de résistance aux antibiotiques, résistants aux sels biliaries et au pH acides, en mesure d'adhérer et de coloniser la muqueuse intestinale, présentent des caractéristiques de croissance avantageuses et viables dans des conditions normales de stockage, produisent des substances antimicrobiennes, ayant la capacité d'inhiber les bactéries pathogènes dans l'intestin, et sont dotés d'une capacité de moduler la réponse immunitaire même de façon transitoire (**Da Cruz et al., 2007**).

Dans ce contexte, ce mémoire a les objectifs suivants :

- 1- Rechercher parmi un ensemble de lactobacilles ceux qui présentent des caractéristiques probiotiques.
- 2- Étudiez la résistance et la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques et leur effet antagoniste sur les bactéries pathogènes en comparaison aux antibiotiques.

CHAPITRE I : Les bactéries lactiques

LES BACTÉRIES LACTIQUES

Définition :

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, qui se trouvent partout dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme. Depuis des millénaires, elles sont utilisées dans l'alimentation humaine. Actuellement, dans l'industrie agroalimentaire les bactéries lactiques occupent une place importante parmi les auxiliaires de fabrication. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans le secteur laitier (Dortu & Thonart, 2009 ; Moraes *et al.*, 2010), elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, les salaisons des viandes et des poissons ainsi qu'en boulangerie. Elles disposent généralement du statut GRAS (Vescovo *et al.*, 1996).

Description générale :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont à Gram positif, peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (Kleinet *al.*, 1998 ; Badis, *et al.*, 2005), sont non pigmentées, immobiles et non sporulantes. Les bactéries lactiques tolèrent des pH acides, ne possèdent pas de catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotoleérant (Hardie & Whiley, 1997). De trop grandes teneurs en oxygène peuvent leur être néfastes en raison de l'absence de chaîne respiratoire. La plupart des bactéries lactiques sont équipées génétiquement pour avoir un métabolisme respiratoire, mais elles sont incapables de respirer si l'hème, n'est pas présent dans le milieu (Lechardeur *et al.*, 2011). L'hème est un cofacteur indispensable au cytochrome c-oxydase le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique (Kandler & Weiss, 1986) comme produit principal du métabolisme en fermentant les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) chez les bactéries homo-fermentaires, en plus de l'éthanol et CO₂ chez les bactéries hétéro-fermentaires.

Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% (Stiles & Holzapfel, 1997) et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb. Les bactéries lactiques se caractérisent par de faibles activités protéolytique et lipolytique et sont très exigeantes en acides aminés et en vitamine B (Caplice & Fitzgerald, 1999). Elles sont

ubiquistes et se trouvent soit libres dans l'environnement, soit en association avec un hôte. Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire, réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation (Stiles, 1996). Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne (Dortu & Thonart, 2009 ; Moraes *et al.*, 2010).

Genre *Lactobacillus* :

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries. Les cellules sont généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (Axelsson., 1993).

Les lactobacilles sont subdivisés, selon leur type fermentaire, en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (Sutra *et al.*, 1998).

- **Groupe I** : il comprend les espèces homo-fermentaires obligatoires. Elles sont Incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C), dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*.
- **Groupe II** : Ce sont les espèces hétéro-fermentaires facultatives. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces, dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles.
- **Groupe III** : Il est constitué des espèces hétéro-fermentaires obligatoires. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, Comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. Sanfransisc*.

Rôle des lactobacilles dans l'industrie agro-alimentaire :

Les lactobacilles sont réponsus dans la nature, et beaucoup d'espèces ont des applications dans les industries agroalimentaires. Elles sont en général plus tolérantes à

l'acidité que les autres bactéries et peuvent, ainsi, terminer beaucoup de fermentations lactiques spontanées comme l'ensilage et les fermentations végétales (Mayra –Makinen et Bigret, 2004).

Les fonctions du ferment :

Parmi les fonctions physiologiques des lactobacilles qui sont très importantes dans l'industrie alimentaire, et qui influence sur les qualités organoleptiques de l'aliment :

- Fermentation des sucres, amener le pH à un niveau bas, ce qui est important pour terminer le phénomène de caillage, et la réduction ou la prévention de la croissance de la microflore adventice ;
- Hydrolyse des protéines, ce qui donne la texture et le goût de l'aliment ;
- La synthèse des composants aromatiques (acétoïne, diacétyl);
- La synthèse des agents de texture (exopolysaccharides), ce qui peut influencer sur la consistance du produit.
- La production des composants inhibiteurs de la flore indésirable.
- La contribution à la fonction diététique de l'aliment. (Tamime, 2002 ; Mayra - Makinen et Bigret, 2004).

Lactobacillus comme ferment dans l'industrie agro-alimentaire :

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie, en laiterie, fromagerie, dans la fabrication de choucroute et interviennent dans les saumures et charcuteries. Dans les yaourts *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* forme des peptides utilisés par *Streptococcus thermophilus* qui forme de l'acide formique qui est capable de le stimuler (synergie). L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de thréonine par l'aldolase de *Lb. Delbrueckii subsp bulgaricus*. Divers lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri...*) interviennent pendant l'affinage des fromages. *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* et *Lb. Delbrueckii subsp bulgaricus* agissent avec *S. thermophilus* dans les fromages à pâte cuite. Dans le kéfir *Lactobacillus kefir*, *Lb. kefiranofaciens* et d'autres lactobacilles mésophiles interviennent à côté de *Candida kefir*, d'autres levures, de *Leuconostoc* et de bactéries acétiques.

Le rôle des *Lactobacillus* est également important dans les végétaux fermentés. Dans les ensilages, il y a d'abord une intervention des coliformes qui utilisent l'oxygène, puis de *Leuconostoc* et d'entérocoques, enfin de *Pediococcus* et de lactobacilles (*Lb.*

plantarum, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. graminis*...). Dans la choucroute, on observe une succession de flore voisine avec *Lb. brevis* puis *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. Sake*. Dans les cornichons, on trouve *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* au côté de *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*. Dans certains pains les Lactobacilles homo ou hétéro-fermentaires (*Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* et surtout *Lb. sanfrancisco*) interviennent au côté des levures.

***Lactobacillus* comme agent contaminant dans les aliments :**

Les lactobacilles contaminent fréquemment les produits alimentaires et sont agents de surissement. Dans les viandes, les lactobacilles provoquent le verdissement par action de l'H₂O₂ qui transforme l'hémoglobine en choléglobine, ou de l'H₂S qui forme de la sulfomyoglobine.

Dans les produits conservés par des acides (pH 3,5-3,8 ; 4-5% d'acide acétique) *Lb. acetotolerans* et d'autres lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. fructivorans*) peuvent résister et causer des altérations (Guiraud et Rosec, 2004).

Bactériocines :

Les bactériocines sont des composés de synthèse ribosomale produites par les bactéries dans le but d'inhiber la croissance des autres bactéries. Ces composés sont trouvés chez la plupart des espèces bactériennes étudiés jusqu'à aujourd'hui. En général, elles ont un spectre d'action restreint, inhibant seulement les bactéries voisines de la souche productrice. Les bactéries à gram + n'inhibent pas les bactéries à gram – et vice versa (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

1.5.1. Bactériocines de Lactobacillus plantarum :

La plupart des bactériocines produites par les lactobacilles, ont une gamme d'activité étroite. *Lb. helveticus* produit *helveticine J* et *lacticine LP27*. *Helveticine J* est une bactériocine inhabituelle, car elle est codée par l'ADN chromosomique et active à pH neutre (Joerger et Klaenhammer, 1986). *Lb. acidophilus* produit de nombreuses bactériocines, y compris *lacticines B* et *F* et *acidocine J1229* (Muriana et Klaenhammer,

1991) et *Lb. casei* produit la *caseicine 80* et *Lb. delbrueckii subsp.lactis* produit *lacticines A* et *B* (Hoover et Chen, 2005).

Lactoline a été la première documentation d'une protéine à effet antagoniste produite par *Lb. plantarum* (Kodama, 1952). Après, d'autres travaux comme ceux d'Andersson (1986), ont montré que certaines bactériocines *Lb. plantarum 83* inhibent *S. aureus* et les *spheroplastes* des bactéries à gram – (Hoover et Chen, 2005).

Effets des lactobacilles sur la santé :

Effets Probiotiques :

Le terme "probiotique" est un mot relativement nouveau qui signifie "en faveur de la vie" et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux. L'observation originale du rôle positif joué par quelques bactéries sélectionnées est attribuée à Eli Metchnikoff, d'origine russe, lauréat du Prix Nobel qui travaillait à l'Institut Pasteur au début du siècle dernier et qui a suggéré que "la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles" (Metchnikoff, 1907). Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2002), au-delà de l'effet nutritionnel. Au sein d'une même espèce, les propriétés probiotiques de souches différentes peuvent être très variables (Isolauri *et al.*, 2004 ; Penaud, 2006).

L'effet probiotique de certains lactobacilles a été et est encore largement étudié. Les lactobacilles font partie de la flore digestive et participent aux effets bénéfiques de la microflore sur l'hôte, que ce soit au niveau métabolique, trophique ou immunitaire (Maragkoudakis *et al.*, 2010 ; Brinques *et al.*, 2010 ; Gross *et al.*, 2010 ; Dicks et Botes, 2010).

Les probiotiques doivent être capables d'exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte par leur croissance et/ou leur activité dans le corps humain. Toutefois, c'est la spécificité de l'action, et non la source du microorganisme, qui est importante. En effet, il est très difficile de confirmer la source d'un microorganisme. Les nourrissons naissent

sans aucune de ces bactéries dans l'intestin, et l'origine de la microflore intestinale n'a pas été entièrement élucidée. C'est leur aptitude à rester viables sur le site cible et à être efficaces qui devrait être vérifiée pour chaque souche potentiellement probiotique (FAO/OMS, 2001).

La figure suivante présente un schéma simplifié du mode d'action des probiotiques :

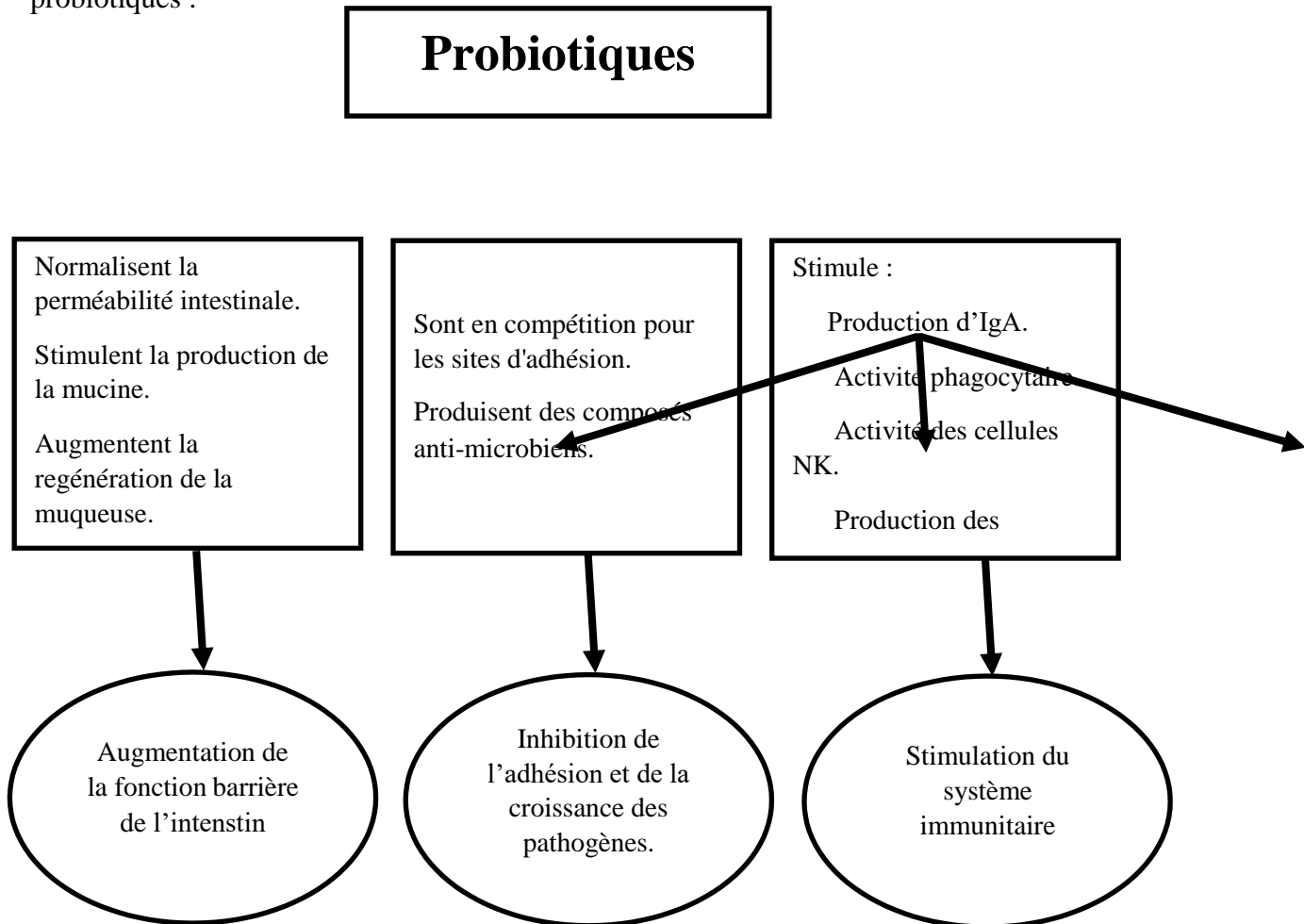


Figure 1 : Mode d'action des probiotiques. Réalisé à partir (FAO/OMS, 2001 ; Gross et al, 2010 ; Dicks et Botes, 2010)

Action nuisible des lactobacilles sur la santé :

Différentes espèces de lactobacilles sont largement étudiées pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Cependant, certaines de ces bactéries ont été impliquées dans plusieurs cas de bactériémies, d'endocardites ou d'infections localisées (Cannon et al., 2005). Il a été montré que dans certains cas, les souches responsables de bactériémies ont des profils en PFGE identiques à une souche utilisée comme probiotique, *L. rhamnosus* GG (Salminen et al, 2004). Les infections dues aux lactobacilles sont rares mais, comme tout micro-organisme, les lactobacilles peuvent être associés à des infections, dans certaines conditions, notamment dans le cas de sujets immunodéprimés ou déjà malades (Salminen et Arvilommi, 2002).

Aujourd'hui, le débat reste encore ouvert sur l'innocuité des probiotiques, qui pourraient être des opportunistes notamment chez les patients immuno-déprimés (Cannon et al., 2005). Cependant, le potentiel de *Lactobacillus spp* de provoquer des infections graves a été évaluée par l'étude de la prévalence de la bactériémie en raison de *Lactobacillus spp* au cours d'une période de 4 ans. Cette étude a indiqué que le potentiel pathogène des *Lactobacillus spp* est faible. Le fait que beaucoup d'aliments traditionnels fermentés contiennent un nombre élevé de *Lb. plantarum*, et que ces produits ont la réputation d'être sûrs et sains partout dans le monde, indiquent clairement que *Lb. plantarum* vivante peuvent être consommés en toute sécurité. Toutefois, dans le cas de la souche *Lb. plantarum* 299v, la sécurité a été directement plus confirmée par une série d'études différentes. *Lactobacillus plantarum* 299v a été donnée à des doses élevées pour des immunodéprimés (enfants vivant avec le VIH) pendant de longues périodes sans effets indésirables (Molin, 2008).

Aspects relatifs à la sécurité sanitaire :

Profils de résistance des probiotiques aux antimicrobiens Comme avec toutes les bactéries, il est a noté une résistance aux antibiotiques parmi certaines bactéries lactiques, y compris des microorganismes probiotiques. Cette résistance peut être liée aux gènes locaux chromosomiques, aux transposons ou aux gènes codés par des plasmides. Toutefois, les informations disponibles sont insuffisantes sur les situations dans lesquelles

ces éléments génétiques pourraient être mobilisés et l'on ignore si dans certains cas cela pourrait devenir un problème clinique. Les scientifiques s'inquiète de l'utilisation dans les aliments de bactéries probiotiques qui contiennent des gènes spécifiques résistants aux antibiotiques. Les bactéries, qui contiennent des gènes transmissibles résistants aux antibiotiques, ne devraient pas être utilisées dans les aliments (FAO/OMS, 2001).

Actuellement, aucune méthode phénotypique normalisée n'est disponible qui soit reconnue internationalement pour des lactobacilles (non pathogènes). Les experts de la consultation FAO/OMS reconnaît qu'il est nécessaire de mettre au point des bio-analyses normalisées pour déterminer les profils d'insensibilité ou de résistance aux antibiotiques des lactobacilles.

Lorsqu'il s'agit de sélectionner des souches probiotiques, il est recommandé que les bactéries probiotiques n'hébergent pas des gènes transmissibles codant une résistance aux antibiotiques utilisés à des fins cliniques. Des recherches sont nécessaires concernant la résistance aux antibiotiques des lactobacilles et le potentiel pour la transmission d'éléments génétiques à d'autres microorganismes intestinaux et/ou d'origine alimentaire (FAO/OMS, 2001).

CHAPITRE II : Les antibiotiques

LES ANTIBIOTIQUES

Définitions :

Les antibiotiques sont des agents dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique. Ils agissent à faible dose pour inhiber la croissance des micro-organismes ou pour les détruire. Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par synthèse et hémisynthèse.

L'origine : Les antibiotiques sont élaborés par un organisme vivant ou produits par synthèse (Yala et al, 2001).

La nature chimique : Ce critère permet de classer les antibiotiques en différentes familles (aminosides, macrolides, phénicolés, bêtalactamines,...) au sein desquelles peuvent exister des groupes ou sous-groupes. En général, à une parenté structurale s'associera un même mode d'action (sur une même cible) et un même mécanisme de résistance (Courvalin, 2008).

Classification des antibiotiques : Pour pouvoir mieux connaître les antibiotiques afin qu'ils soient utilisés à bon escient, on a procédé à leur classification selon certains critères :

- Les antibiotiques ayant une même structure chimiques, à l'origine de leur mécanisme d'action, se classent dans une même famille ;
- Au sein d'une même famille, les antibiotiques peuvent se différencier par leur spectre d'activité et sont réunis alors dans des groupes ;
- Au sein d'un même groupe, l'activité antimicrobienne est identique mais les antibiotiques peuvent se différencier par leur propriété pharmacologique ou leur tolérance (TALBERT, et al ., 2009).

Mode d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent avoir 2 modes d'action :

- Action bactériostatique : ILS empêchent le développement des bactéries ou germes microbiens.
- Action bactéricide : Ils détruisent les bactéries ou les germes microbiens en agissant sur la paroi, l'ADN, la membrane cytoplasmique et la synthèse de protéines.

Les antibiotiques peuvent agir sur :

La paroi bactérienne :

Bacitracine, Pénicilline et Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire. La nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne (Zeba, 2005).

La membrane cellulaire :

En désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur

L'ADN :

Certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques (Flandrois et al ., 1997), les quinolones et fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase (Chopra, 1998).

Le ribosome bactérien :

Sur les ribosomes : ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales. Les aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamycine, amikacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes (Hermann, 2005). Les phénicolés (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la petite sous-unité (Flandrois et al., 1997) les macrolides et les kétolides (érythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (Nilius et Ma,

2002). La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaîne peptidique.

Autres : en agissant tant qu'anti métabolites bactériens (c'est à dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries).

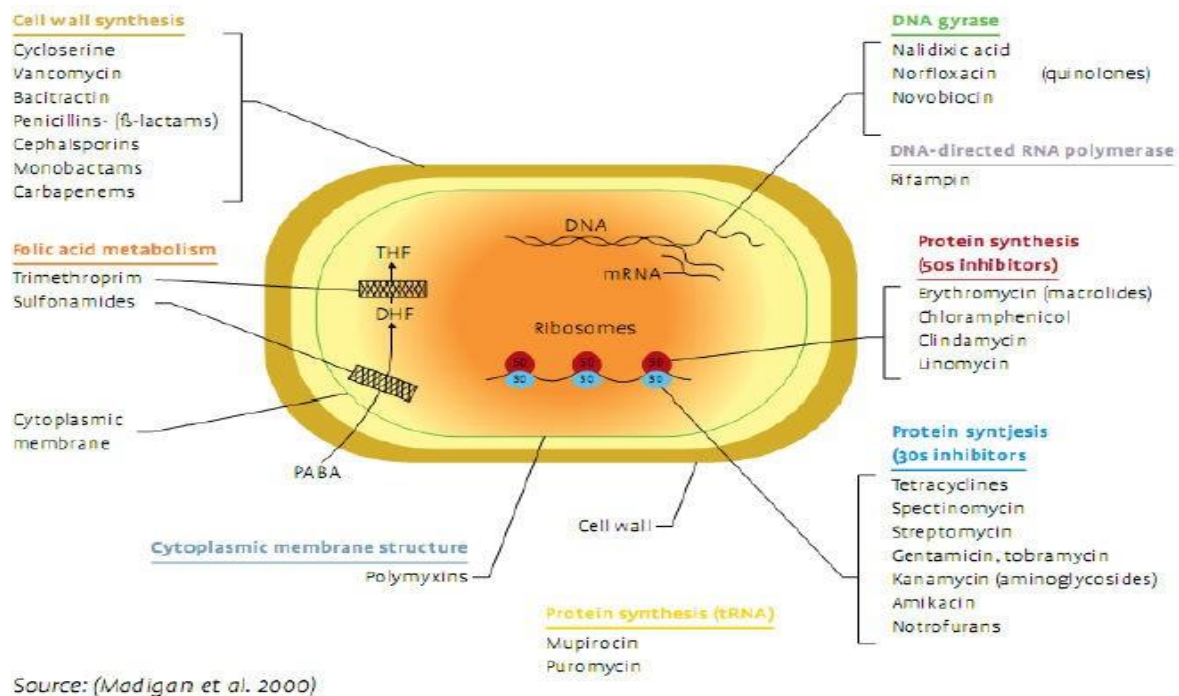


Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques

L'antibiorésistance :

Définition :

L'antibiorésistance c'est la capacité d'une souche bactérienne de se développer en présence d'une concentration d'antibiotique notamment plus élevée qui inhibe le développement de la plupart des autres souches de même espèce. La définition de la résistance bactérienne peut être clinique ou microbiologique.

Résistance microbiologique : On appelle résistance microbiologique la possibilité pour une bactérie de se multiplier *in vitro* en présence de concentration d'antibiotique supérieure à celle qui permet normalement d'inhiber la croissance des bactéries de même espèce.

Résistance clinique : On appelle résistance clinique l'évolution clinique défavorable d'une infection sous traitement antibiotique, cet échec de l'antibiothérapie peut avoir des coûts multiples.

Cette antibiorésistance s'explique par l'existence, chez les bactéries, de gènes leur permettant d'échapper à l'action des antibiotiques. Elles sont capables de transférer ces gènes à d'autres bactéries qui deviennent résistantes à leur tour. Il s'agit donc d'une forme transmissible de la résistance. Elle est liée au mauvais usage des antibiotiques, prescrits en cas d'infections virales, ventes d'antibiotiques sans prescription, pratiques d'automédication.

L'antibiorésistance chez les bactéries lactiques :

Les aliments fermentés ou non, qui ne subissent pas de traitement avant leur consommation, peuvent constituer un véhicule pour les bactéries résistantes aux antibiotiques en conférant ainsi un lien direct entre la microflore indigène des animaux et celle du tractus gastro-intestinal de l'Homme (Mathur et Singh, 2005). En effet, ces produits contiennent des bactéries lactiques qui pénètrent en grand nombre dans nos intestins et interagissent avec notre flore intestinale ; il se peut que certaines de ces bactéries soient porteuses de gènes d'antibiorésistance potentiellement transmissibles et il est possible que cette résistance soit transmise à des populations bactériennes humaines, notamment opportunistes et pathogènes, à travers la chaîne alimentaire (Mathur et Singh, 2005 ; Ammor et al., 2007). Ainsi, ces bactéries occupent, comme a été déjà indiqué, une grande variété d'habitats ce qui augmente les possibilités de leur implication dans le phénomène d'antibiorésistance. De même, l'introduction commerciale de probiotiques contenant des souches résistantes aux antibiotiques peut également avoir des conséquences négatives dans le cas où la résistance est transférée à des pathogènes intestinaux (Mathur et Singh, 2005).

Génétique de l'antibiorésistance chez les bactéries lactiques :

La sensibilité réduite à certains antibiotiques n'est pas une caractéristique inhabituelle des bactéries lactiques. Plusieurs de ces résistances peuvent être dues à des caractéristiques intrinsèques complexes tels que les propriétés métaboliques des bactéries (Kastner et al., 2006), et à la présence d'un grand nombre de ces bactéries dans les produits fermentés et le tractus gastro-intestinal favorisant ainsi l'apparition de différents mécanismes de résistance par mutations (Ammor et al., 2007). Les données disponibles sur les résistances intrinsèques chez les bactéries lactiques sont relativement rares ; **le tableau 1** en illustre quelques-unes. Cependant, il existe toujours des différences entre et à l'intérieur des espèces. Ces bactéries peuvent également, comme a été déjà évoqué, acquérir des gènes de résistance provenant des autres bactéries de l'écosystème dont elles font partie. Ces gènes peuvent être portés sur le chromosome principal de la bactérie ou sur des éléments génétiques mobiles (plasmides,

transposons, intégrons), et ils ont, dans tous les cas, la capacité de se transmettre entre les bactéries qui, du coup, acquièrent l'élément responsable de leur nouvel état de résistance face à tel ou tel antibiotique (Davies, 1994 ; Tremblay, 2007).

Tableau 1 : Quelques résistances naturelles rencontrées chez les bactéries lactiques.

Espèce	Antibiotique	Référence
Entérocoque	Céphalosporines, faible concentration d'aminosides et de clindamycine.	Knudtson et Hartman, 1993 ; Teuber et al, 1999.
Lactobacilles	Vancomycine.	Simpson et al. ,1988 ; Hamilton-Miller et Shah, 1998.
Certains lactobacilles	Vancomycine, bacitracine, céfoxitine , ciprofloxacine, acide fusidique, kanamycine et gentamicine , métronidazole, nitrofurantaoine , norfloxacine, Streptomycine et sulfamides.	Danielsen et Wind, 2003.
Pédiocoques	Vancomycine.	Simpson et al. ,1988 ; Hamilton-Miller et Shah, 1998.
Leuconostocs	Vancomycine.	Simpson et al. ,1988 ; Hamilton-Miller et Shah, 1998.
Streptocoques	Aminoglycosides, péfloxacine.	Euzéby, 2007.

Type de résistance :

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

Résistance naturelle ou intrinsèque :

Cette résistance, généralement chromosomique, est présente chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques et elle est due soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique (Levy et Marshall, 2004 ; Zomahoun, 2005 ; Courvalin, 2008). Cette résistance n'est pas transférable horizontalement et elle ne présente donc aucun risque chez les bactéries pathogènes (Normark et Normark, 2002 ; Levy et Marshall, 2004 ; Mathur et Singh, 2005).

Résistance acquise :

Cette résistance ne concerne que quelques souches, d'une même espèce ou d'un même genre, normalement sensibles à un antibiotique donné (Zomahoun, 2005 ; Mathur et Singh, 2005 ; Courvalin, 2008). Elle est due à des modifications génétiques chromosomiques ou extrachromosomiques : mutations sur des gènes existants (gènes codant pour des cibles des antibiotiques, gènes régulateurs...) ou incorporation de nouveaux gènes codant à des mécanismes de résistances (Levy et Marshall, 2004 ; Zomahoun, 2005 ; Mathur et Singh, 2005). Ces gènes peuvent être originaires des micro-organismes producteurs d'antibiotiques (Davies, 1997) ou bien des gènes dont les produits originaux jouent un rôle dans le métabolisme bactérien mais qui ont subi des mutations à plusieurs reprises qui ont changé leurs substrats de substrats appropriés à des voies de biosynthèse ou biodégradation à des antibiotiques (Davies, 1994). Cette résistance peut être disséminée par transfert horizontal entre bactéries (Mathur et Singh, 2005).

Le développement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries est basé principalement sur deux facteurs : la présence de gènes de résistance et la pression de sélection imposée par l'utilisation des antibiotiques (Levy, 1992). Cette pression joue un rôle

clé dans l'émergence de bactéries résistantes : quand une population bactérienne mixte est exposée à des antibiotiques, il est probable qu'il y aura des bactéries résistantes à la concentration appliquée de ces agents. Cependant, sous la pression de sélection, le nombre de ces bactéries va augmenter et certaines d'elles peuvent transmettre leurs gènes de résistance à d'autres membres de la population (Aarestrup, 1999).

II.7.2. 1.Chromosome :

La taille du chromosome des bactéries lactiques avait été estimée entre 1,8 et 3,4 Mb selon les espèces, et elle peut varier sensiblement au sein d'une même espèce (Davidson et al, 1996). A titre d'exemple, *Lb. plantarum* et *En. Faecalis* possèdent les plus grands chromosomes avec une taille aux environs de 3,4 Mb (Renault, 2008) et ceux de *Lc. Lactis IL1403* et *Lb. gasseri ATCC 33323* ont des tailles de 2,42 Mb et 1.96 Mb, respectivement (Morelli et al, 2004).

Les gènes portés par les chromosomes de ces bactéries sont généralement ceux indispensables à la survie de ces dernières (Luquet, 1994). Toutefois, Danielsen (2002) a démontré que le gène de résistance à la tétracycline tetM détecté chez six différentes souches de lactobacilles n'est pas porté par des plasmides mais il est probablement situé sur le chromosome.

II.7.2. 2.La résistance extra-chromosomique

a. Plasmides

Les premiers plasmides de résistance aux antibiotiques ont été décrits au Japon en 1950, lors d'une épidémie de dysenterie bacillaire à *Shigella flexneri*. Depuis cette date, des plasmides de résistance ont été retrouvés chez de très nombreuses espèces et on a constaté que la résistance plasmidique concerne de très nombreux antibiotiques. Les caractéristiques de cette résistance sont :

- Le niveau de résistance plasmidique est en général élevé.
- Phénomène liée directement à l'utilisation d'antibiotiques : les antibiotiques à spectre large peuvent sélectionner dans les populations commensales de l'organisme les bactéries porteuses de plasmides R.
- Phénomène non spécifique d'une famille d'antibiotique. Plusieurs groupes d'antibiotiques différents sont touchés après administration d'un seul d'entre eux la perte d'un ou plusieurs caractères de résistance est possible mais rare.

b. Les transposons

Ce sont des fragments d'ADN, capable de changer leur localisation dans le génome sans jamais apparaître à l'état libre. Ils codent pour les déterminants de la transposition et ceux d'autres fonctions telles que la résistance aux antibiotiques en s'intégrant soit dans le chromosome soit dans le plasmide, en allant de l'un à l'autre.

II.7.2. 3. Résistance par acquisition des gènes transférés

Les résistances par acquisition d'ADN sont la conséquence d'un transfert horizontal y compris entre espèces éloignées phylo génétiquement. Les bactéries utilisent trois mécanismes principaux de transfert horizontal d'éléments génétiques entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces et de genres différents : la transformation, la transduction et la conjugaison.

Les gènes de résistance aux antibiotiques, pour la plupart chromosomiques, proviennent généralement de micro-organismes producteurs d'antibiotiques pour lesquels ils sont immunisés. Le transfert de ces gènes sera rendu plus efficace après leur intégration sur des éléments mobiles tels que les plasmides, les transposons, les intégrons ou encore sur des phages. Ces mécanismes de résistance peuvent alors diffuser très rapidement dans une population (Fig1)

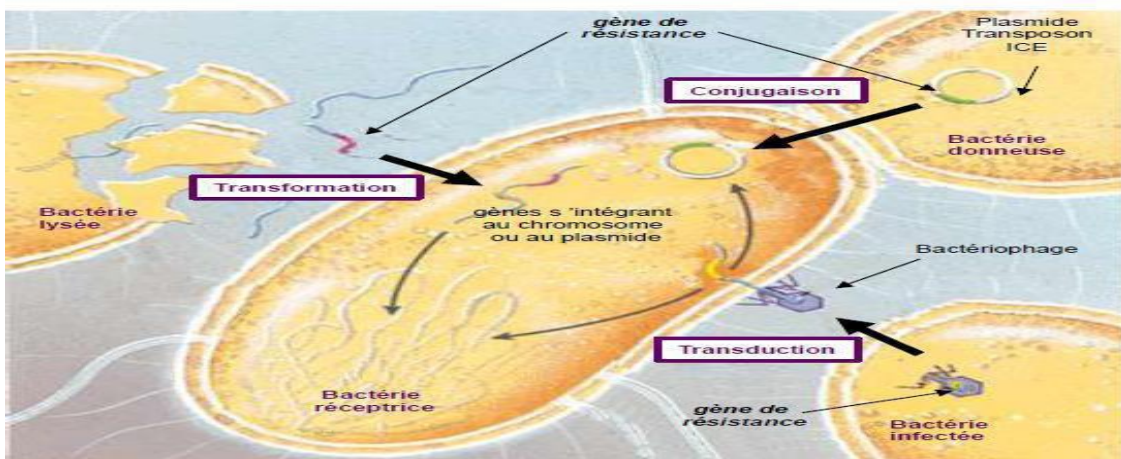


Figure 3. Diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques

La résistance croisée

La résistance croisée est un phénomène par lequel une bactérie qui a développé une résistance à l'un des antibiotiques d'une classe devient aussi résistante aux autres membres de la même classe. Cela même si elle n'a jamais été exposée à ces molécules. C'est cette résistance croisée qui permet aux β -lactamases à spectre étendu (BLSE) présentes chez les

bactéries à Gram négatifs d'avoir une résistance si étendue (β -lactamines et céphalosporines) à tel point qu'elles deviennent un véritable enjeu en santé humaine.

La Co-résistance

Plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun des mécanismes confère par résistance croisée la résistance à un groupe d'antibiotique conférant à la bactérie un large spectre de résistance.

Spectre d'activité :

Toute une histoire de concentrations...

L'activité antibactérienne est caractérisée *in vitro* par :

- La concentration minimale inhibitrice (CMI) : concentration la plus faible d'un antibiotique capable d'empêcher le développement d'un micro-organisme après 18 à 24h d'incubation à 35°C. C'est une valeur indicatrice du pouvoir bactériostatique.
- La concentration minimale létale ou bactéricide (CMB ou CML) : concentration la plus faible capable d'entraîner la mort d'au moins 99,9% des bactéries d'un inoculum standardisé à 10⁵-10⁶ bactéries/mL (< 0,01% de survivants). C'est une valeur indicatrice du pouvoir bactéricide.

On détermine ainsi l'activité intrinsèque d'un antibiotique selon le rapport CMB/CMI :

- $CMB/CMI \leq 2$ Antibiotique bactéricide.
- $CMB/CMI = 4$ à 16 Antibiotique bactériostatique.
- $CMB/CMI > 16$ Bactérie "tolérante" à l'antibiotique (8).

Antibiogramme :

L'antibiogramme est un examen bactériologique de référence qui consiste à cultiver des bactéries présentes dans un prélèvement pour les identifier et ensuite tester sur les colonies obtenues divers antibiotiques. Il permet, d'une part, de prédire la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques dans un but essentiellement thérapeutique mais également de surveiller l'épidémiologie des résistances. Il faut néanmoins avoir à l'esprit que cet examen étudie l'effet des antibiotiques *in vitro* le plus souvent et dans des conditions de culture normalisées. Il faut donc déterminer des corrélations afin d'apprécier l'efficacité *in vivo* de l'antibiotique et donc la réussite (ou l'échec) du traitement sur la base de données *in vitro* (Makhloufi, 2012).

CHAPITRE III : Matériel et méthode

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Afin de prouver les hypothèses ci-dessus, nous avons préparé un ensemble d'expériences qui sont résumées dans Résistance aux antibiotiques, recherche de l'antagonisme des bactéries lactiques vis à vis des bactéries pathogènes et sélection des souches à caractère probiotique. Utiliser du matériel de laboratoire parmi eux : autoclavage, étuve,.....

Travailler dans des conditions réglementaires pour éviter les risques biologiques.

Souche bactérienne :

Nous avons utilisé sept (07) souches lactiques pour la réalisation de cette étude (**tableau 02**).

Tableau 2 : Souches et leurs origines

Souche	Origine	Identification
CHTD27	Lait de chamelle de Tindouf	<i>Lactobacillus brevis</i>
BH14 CHV14 NSC10, NSCA1, NSC5C, JUM4	Lait de chamelle d'Illizi Lait de chèvre de Saida Lait de chamelle de Naama Lait de jument de Saida	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Souches pathogènes :

Six (06) souches Pathogènes ont été utilisées dans cette étude : *Bacillus cereus*, *E.coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenese*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, appartenant à la collection du laboratoire de biologie des microorganismes et de biotechnologie (LBMB).

Milieu de culture :

MRS : Nous avons utilisé le milieu MRS (**De Man et al ., 1960**) qui est un milieu « complet » et différentiel pour les bactéries lactiques qui sont des bactéries exigeantes. Ce milieu est composé de : le glucose, l'acétate, citrate, le sulfate de magnésium, le sulfate de manganèse, peptone, extrait de viande et de levure ainsi que le tween 80. Son pH finale = 6,2.

LB : Le milieu ou luria – bertani (**Miller ,1972**) était utilisé pour les cultures des bactéries pathogènes à 37°C avec agitation. Ce milieu est composé de : 10g de tryptone, 5g d'extrait de levure et 10g d'chlorure de sodium. À un pH final de 7.

Purification des souches lactiques :

La purification des souches était réalisée sur milieu solide MRS par la méthode des stries.

Pour confirmer l'appartenance de ces bactéries au groupe des bactéries lactiques, nous avons eu recours à différents types d'observations :

Une observation macroscopique : Observation macroscopique des colonies après la culture des souches sur milieu MRS pour révéler la taille, la forme, l'aspect et la couleur des colonies.

Cette observation à l'oeil nu est une première clé d'identification (**Philippon et al., 2007**).

Une observation microscopique : On observe l'aspect microscopique par coloration De gram. Les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**). Les bactéries lactiques sont à gram positive.

Test de la catalase :

Cette technique nécessite de prendre une partie de colonie dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. Une réaction positive révèle immédiatement un dégagement de bulles gazeuses (**Marchal et al., 1991**), la souche est alors dite catalase (+), pas de bulle catalase (-) (**prescott et al . , 2003**)

Les bactéries Gram positifs et catalase négative sont présumées des bactéries lactiques. (**Belarbi, 2011**).

Etude le type de fermentation : On ajoute 100µl de culture jeune des souches lactiques à chaque tube qui contient le bouillon MRS stérile (10ml) et une cloche de Durham pour connaître le type fermentaire des souches , homofermentaire (pas de production de gaz) ou hétérofermentaire (production de gaz) (**Hariri et al,2009**) .L'incubation des tubes est effectuée à 30°C pendant 24h~48h.

Conservation des souches :

La conservation des souches peut être de courte ou longue durée :

Une conservation de court durée se fait par un ensemencement d'une colonie sur une gélose inclinée MRS, après une incubation à 30°C pendant 24h, conservé la gélose à 4°C le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines (**Badis et al., 2005**) mais une conservation de longue durée sont conservées dans une solution contenant 70% de lait écrémé (enrichie par 0.5g/l d'extrait de levure et 0.5% de glucose) et 30% de glycérol à 40% à - 20 °C (**Samelis et al .,1994**)

Test de probiotique :

Recherche de la résistante à l'acidité : Cette technique décrite par **Hyronimus et al. (2000)**. Nous avons préparé un bouillon MRS ajusté à différents pH (une série de pH 1-6). Les souches testées sont ensemencées à partir de cultures fraîches dans la série de tube à différent pH à raison d'1%. La croissance est mesurée après 24h s'incubation à 37°C par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600nm.

Recherche du résistant aux sels biliaires : Pour déterminer l'aptitude des souches lactiques à résister à la bile une méthode de **Khalil et al. (2007)**.

Pour la réalisation de ce test nous avons préparé une série de tubes contenant du bouillon MRS additionné de bile de mouton à des concentrations croissante (0.5% ; 1% ; 5% et 10%). La bile a été stérilisée à l'aide d'un filtre millipore stérile (0,22µm) puis a été rajoutée au bouillon MRS préalablement autoclavé. Les lactobacilles sont ensemencés dans chaque tube à raison de 1% à partir d'une culture fraîche des souches étudiées la série de tube est alors incubée à 37°C pendant 24h. La croissance alors est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600nm.

Test anti biogramme: (Vedel, 2005; CA-SFM, 2010)

Principe :

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classe semi-quantitatives (Sensible S, intermédiaire I ou résistante R) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Technique :

Préparation d'une pré-culture des souches étudiées nécessaire avant la réalisation des différents tests, on prend des colonies de chaque souche qui est conservée sur la gélose inclinée dans une tube contenant à 5 ml le milieu de culture. Ces pré-cultures sont incubées à 30°C pendant 24h.

Ensuite ; nous prenons un tube contenant 20ml de gélose molle qu'on ensemence avec 1% de la pré-culture précédemment réalisées, après l'agitation le milieu est ensuite coulé sur des boîtes Pétri stérile. Une fois le milieu séché on dépose les disques d'antibiotiques stérilement à l'aide pince flambée à l'alcool à la surface du milieu. Après incubation 30°C pendant 24h on observe la zone d'inhibition qui entoure les disques, pour le diamètre inférieur à 15mm la souche est dite résistante à l'antibiotique testé et pour un diamètre supérieur ou égal à 15mm. La souche est sensible à l'antibiotique (**Karam et al., 1994**).

Antibiotique Testé :

Tous les disques d'antibiotique utilisé dans cette étude (**tableau 03**) voir annexe

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques en milieu liquide :(Mims et al ., 1993)

Préparation des solutions mères :

Nous avons mesuré la CMI de deux antibiotique sélectionnés vis à vis des souches bactériennes (NSC5C, NSC10) *Pénicilline G* et *Gentamycine*. Nous avons préparé une solution initiale de chaque antibiotique :

- Une solution (A) à 20mg/ml
- Une solution (B) à 30mg/ml

Tableau 3 : Les différents disques d'antibiotique utilisé

Antibiotique	Concentration des solutions mères mg/ml	Solvant
Gentamycine (A)	12	Eau distillée stérile
Pénicilline G (B)	80	Eau distillée stérile

Après préparation des solutions mères des deux antibiotiques. Nous avons effectué des dilutions (1/2) dans les microtubes d'une même ligne sur une microplaque stérile, ensuite en ajoutant chaque microtube 20µl de pré-culture des deux souches étudiées. La plaque est ensuite incubée à 30°C pendant 24h.

Etude de l'activité antimicrobienne :

L'activité antibactérienne des souches lactobacillus contre les souches pathogènes est testée par deux méthodes :

La méthode directe (par les disques stériles)

Pour se faire, la méthode décrite par **Fleming et al. (1975)** et **Allende et al. (2007)**, a été utilisée. Le milieu MRS bouillon ensemencé par les souches lactiques (pré culture) et LB bouillon par les bactéries pathogènes après 24h d'incubation, différents tubes de gélose molle LB sont ensemencés d'1% de pré-cultures pathogènes que nous souhaitons tester. Après ça couler les boites pétri stériles après sèche le milieu nous nous immergeons les septes (07) disques chacun dans propre souche lactique pendant plusieurs seconds. Après agitation les géloses molles sont coulées et des disques de papier Whatman préalablement imbibés de cultures fraîches de lactobacilles sont déposés à la surface après séchage du milieu.

La méthode indirecte (test des puits)

Décrite par **Barfoot et Klaenhammer, (1983)**, Cette méthode utilise le surnageant de la souche lactique contre la souche pathogène. Le test est réalisé comme suite :

Une culture jeune de bactéries lactiques est centrifugée (400rpm /30min), en prendre le surnageant et le conserver.

Dans une boîte pétri contenant de la gélose LB etensemencé par la souche pathogène (1%) après le séchage des puits sont creusés à l'aide d'emporte-pièce stérile. Les puits sont ensuite remplis de 100µl de surnageant de la souche lactique, les boîtes sont en premier lieu placées à 4°C pendant 2h~4h pour permettre une meilleure diffusion de la substance active, puis incubées à 37°C pendant 24h.

Identification moléculaire :

Une identification moléculaire a également été réalisée par le séquençage de Sanger du gène de l'ARNr 16S de longueur totale. L'ADN total a été extrait de la culture d'une nuit de la souche en utilisant la méthode au phénol-chloroforme (Chomczynski et Sacchi et 1987). Une amplification a été effectuée par PCR en utilisant les amorces 16S-27F et 16S-1492R (27F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 'et 1492R 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') et également 16S-27F et 16S-19R (27F-5AGGAGGG). ' Et 19R 5'-GRG TAC CTT TTA TCC GTT G-3 'tandis que R, A ou G) (Lane, 1991) afin d'amplifier les segments du gène V1-V2 16S pour les 3 souches. Les conditions de PCR ont été réalisées avec le mélange 5 x HOT BIOAmp® Evagreen HRM à 12,5 mM, 2 µl de Enhancer 10X et 4 µl de MgCl₂, en utilisant 1 µM d'amorces directes et inverses et 2 µl de matrice d'ADN génomique dans un volume total de 20 µl. Les conditions de cyclage de la PCR étaient les suivantes: une première étape de dénaturation à 96 ° C pendant 12 minutes, 45 cycles de dénaturation à 96 ° C pendant 20 secondes, un anelage à 52° C pendant 20 secondes, une extension à 72 °C pendant 1 minute 30 secondes, suivi d'une étape d'élongation à 72 ° C pendant 5 min. Le séquençage a été réalisé dans les laboratoires Biofidal (Lyon, France).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Identification des lactobacilles :

L'ensemble des lactobacilles testés appartient à la collection du laboratoire de biologie des microorganismes et de biotechnologie (LBMB) de l'université d'Oran Es-Sénia. La pureté des 7 souches de *Lactobacillus* a été étudiée selon les caractéristiques morphologiques et biochimiques.

Etude des caractères morphologiques

IV.2. 1.L'aspect macro et microscopique :

Macroscopique : L'observation des colonies purifiées de *Lactobacillus* sur milieu MRS solide (Mann et Spoerry, 1974) à pH 6,5 après 24h d'incubation à 37°C (Anabeien Flozer et al., 2006) révèle des colonies blanchâtres, crémeuses, de taille variable (entre 0.1 et 0.3mm de diamètre).

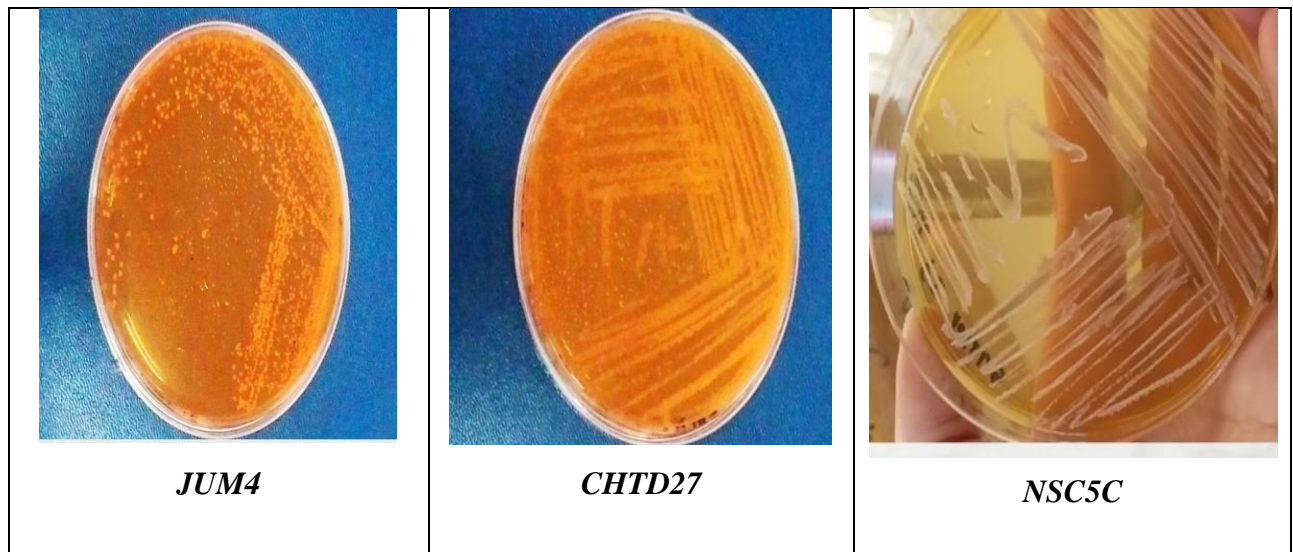


Figure 4 : Aspect des colonies de *Lactobacillus* (NSCA, JUM4 et NSC5C) sur le milieu MRS

Observation microscopique :

L'observation des cellules bactériennes a été effectuée après coloration de Gram au grossissement $\times 100$ via un microscope photonique.

Toutes les souches observées révèlent des cellules de forme bacillaire (bâtonnet plus ou moins allongé) de couleur violette témoignant de l'appartenance des souches au groupe des Gram positives.

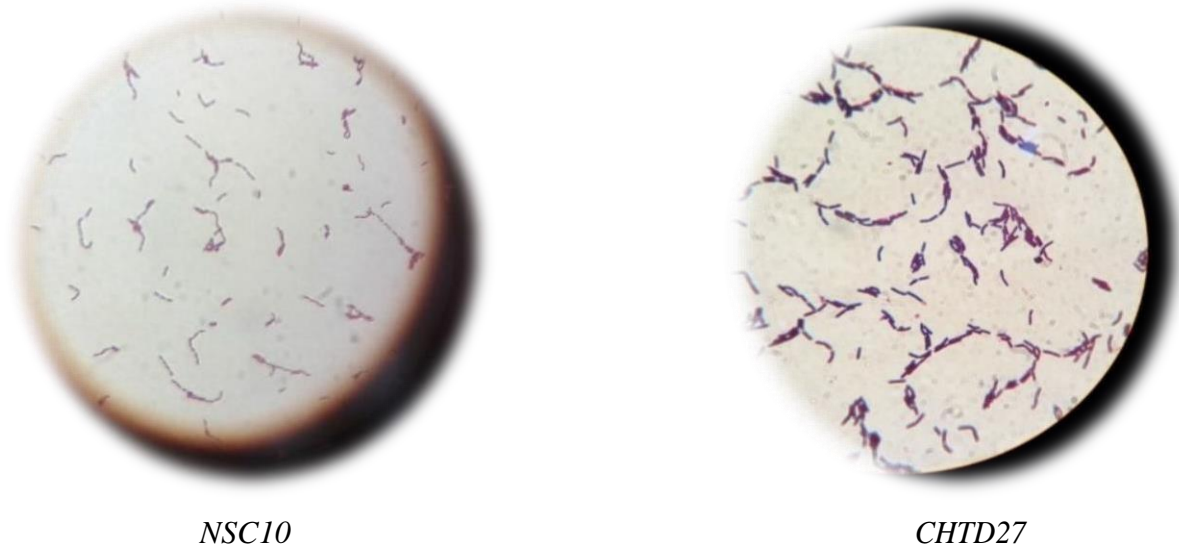


Figure 5: Aspect microscopique des souches *NSC10* et *CHDT27* (X100).

IV.2. 2. Test enzymatique (test de catalase) :

Nous avons testé l'ensemble des souches pour la recherche de catalase. Comme le montre la figure ci-dessous.



A : 1(NSCA), 2(NSC5C), 3(BH14)



C (*CHV14*)

Figure 6 : Résultats du test de catalase.

Le test de la catalase a révélé que les 7 souches étaient négatives à la réaction de la catalase. Selon le Bergey's Manuel de la Systématique Bactérienne « les Firmicutes », les lactobacilles sont catalase négative (De Vos et *al.*, 2009).

IV.2. 3. Test fermentaire :

Ce test nous permet de révéler si les souches sont homofermentaires (production de lactate uniquement) ou bien hétérofermentaire (production de lactate et de CO₂) (**Bourel et al., 2001**), en cas de production de gaz, le CO₂ sera recueilli dans la cloche de Durham. (**Kihal et al., 1996**)

On n'a observé aucune production de gaz dans la cloche de 6 tubes sur 7. Les souches sont homofermentaire mis à part la souche CHTD27 qui a produit une petite quantité de CO₂, elle est donc homohétérofermontaire en se basant sur la classification classique des lactobacilles en fonction de leurs propriétés fermentaires (**STILES et HOLZAPFEL, 1997**).

Tableau 4 : Résultat de l'étude de pouvoir fermentaire des souches de lactobacilles.

Souche	Type fermentaire	Souche	Type fermentaire
<i>NSC5C</i>	Homofermentaire	BH14	Homofermentaire
<i>NSC10</i>	Homofermentaire	CHV14	Homofermentaire
<i>NSCA1</i>	Homofermentaire	CHTD27	Homo-hétérofermontaire
<i>JUM4</i>	Homofermentaire		

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. (**Thompson et al., 1994**).

T	NSC5C	NSCA	CHTD27	JUM4	NSC10	CHV14	BH14
----------	--------------	-------------	---------------	-------------	--------------	--------------	-------------



Figure7 : Test de fermentation des 7 souches de *Lactobacillus*.

Croissance des bactéries lactiques en milieu acide :

Nous avons évalué la croissance de nos souches dans une gamme de pH comprise en pH 1 à pH6, la croissance a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm après 24h d'incubation à 37°C.

Tableau 5 : Résultat de la croissance de bactérie lactique en milieu Acide.

pH	<i>BH14</i>	<i>NSC5C</i>	<i>CHV14</i>	<i>CHTD27</i>	<i>JUM04</i>	<i>NSC10</i>	<i>NSCA1</i>
pH1	0.150	0.277	0.330	0.243	0.300	0.314	0.377
pH2	0.260	0.294	0.274	0.160	0.162	0.200	0.273
pH3	0.360	0.400	0.255	0.171	0.232	0.277	0.264
pH4	1.335	2.391	2.372	0.387	1.482	2.399	2.462
pH5	2.900	3.095	3.107	2.312	2.622	2.980	2.947
pH6	2.921	3.155	3.055	2.741	2.811	2.971	2.992

Ces résultats indiquent clairement que le meilleur tant d'acidité favorisant la croissance des bactéries apparait en pH4, pH5, pH6.

Dans les milieux à pH3- pH2 nous avons observé une croissance bactérienne mais qui reste assez faible.

L'acidité aurait exercé un stress important sur les cellules de lactobacilles empêchant toute croissance aux pH les plus bas (**Gibson et al., 2005**).

Notons enfin que les trois *lactobacilles plantarum* présentent les meilleures résistances à l'acidité sont la NSC5C, la CHV14 et la NSC10

Croissance des bactéries lactiques en présence sels biliaires :

Plusieurs travaux ont montré que la croissance des lactobacilles en présence de sels biliaires varie selon la souche, la concentration de la bile Selon **Dunne et al. (2001)**.

Les résultats obtenus ont montré une bonne croissance aux différentes concentrations en sels biliaires (0.5%, 1%, 5%, 10%). (**Tableau 6**).

La mesure de la croissance par spectrophotométrie, des différentes séries de milieux a révélé :

- Un ralentissement de croissance pour la culture en milieu contenant **5%** et **10%** de sels biliaires mis à part les trois souches : CHV14, NSC10, NSC5C *Lactobacillus plantarum* qui ont pu se développer de façon remarquable quelle que soit la concentration du milieu en sels biliaires (**Amara S., (2012) ; EL JENI et al., (2015)**).

Tableau 6 : Croissance des bactéries lactiques en présence sels biliaires (DO600 nm) :

Souche %	<i>BH14</i>	<i>NSC5C</i>	<i>CHV14</i>	<i>CHTD27</i>	<i>JUM4</i>	<i>NSC10</i>	<i>NSCA</i>
0.5%	1.340	0.785	1.636	1.62	1.570	1.420	1.436
1%	1.120	1.227	0.704	0.801	0.969	1.460	0.916
5%	1.195	1.499	1.500	1.537	1.396	1.433	1.250
10%	1.749	1.808	1.700	1.750	1.663	1.776	1.813

Cette résistance ou sensibilité de ces bactéries aux sels biliaires pourrait se traduire par la capacité de celles-ci à les déconjuguer, hydroxyler, déshydrogéner ou les déglucorinider. Ainsi la caractéristique la plus recherchée chez les probiotiques est la déconjugaison des sels biliaires car celle-ci pourrait avoir un effet sur la diminution du taux de cholestérol dans le volume sanguin (Malago et al, 2011).

IV.4. Détermination des profils de résistance des antibiotiques

1. Résistance aux antibiotiques chez les bactéries lactiques :

Nous avons testé la résistance des 7 souches de bactéries lactiques vis-à-vis de 25 ATB de différentes familles, et la mesure de diamètre des zones d'inhibition (karam et karam, 1994) chaque souche pour chaque ATB testés permet de caractériser les souches comme étant sensibles ou résistantes. Nous n'avons considéré que le diamètre : > 15 (Sensible).

<15 (Résistante).

Un exemple d'antibiogramme est présenté dans la figure 8 :

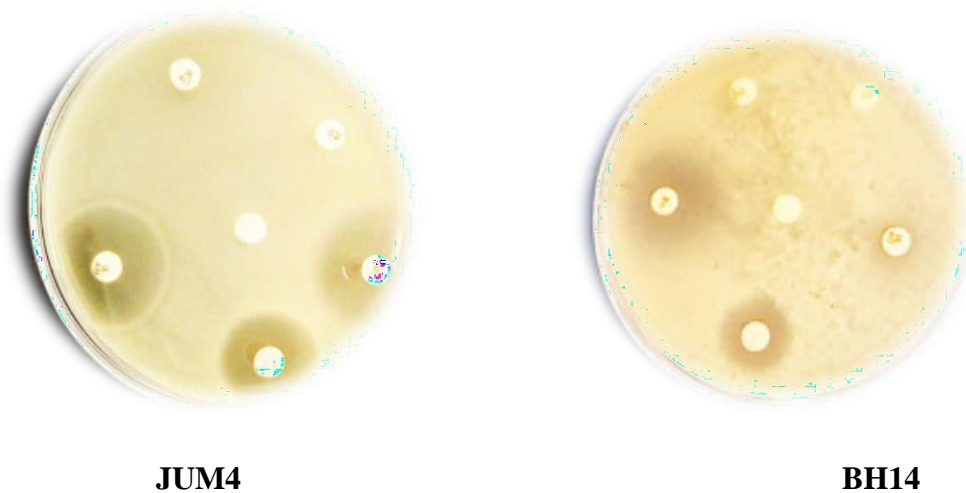


Figure 8 : Résultats de l'antibiogramme de quelques souches de *Lactobacillus*

Les résultats obtenus pour l'ensemble de souche sont présente dans **le Tableau 7.**

Tableau 7 : Résultats de l'antibiogramme des souches de lactobacilles.

Antibiotique	Abbreviations	<i>NSC5C</i>	<i>CHTD2</i> 7	<i>NSCA</i>	<i>BH14</i>	<i>CHV10</i>	<i>NSC10</i>	<i>JUM4</i>
CEFPIME	FEP	S	S	S	R	S	R	S
ERYTHROMICINE	E	S	S	S	S	S	R	S
CHLORAMPHE NICOL	C	S	S	S	S	S	S	S
PENCILINNI	P	S	S	R	R	R	R	R
GENTAMICIN	CN	R	R	R	R	R	R	R
PRISTINAMYCIN	PT	S	S	S	S	S	S	S
CEFIOCIME	CFM	S	S	S	S	S	R	S
FOSFOMYCIN	FOS	R	S	R	R	R	R	R
OXACILLIN	OX	R	R	R	R	S	R	R
TOBRAMYCIN	TOB	R	S	R	R	R	R	R
AMIKACIN	AK	R	R	R	R	R	R	R
CLINDAMYCIN	CD	R	R	R	R	R	R	R

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

COLISTIN	CS	R	R	R	R	R	R	R
KANAMYCIN	K	R	S	R	R	R	R	R
AMOXICILLINE+ ACIDE CLAVULANIQUE	AMC	S	S	S	S	R	S	S
AMPICILLIN	AMP	S	S	S	S	S	R	S
CEFTAZOLIN	KZ	S	S	S	S	S	R	S
CEFOXITIN	FOX	S	S	S	R	S	R	S
CEFTAZIDIME	CAZ	S	S	S	R	S	R	S
CEFOPERAZONE	CFP	S	S	S	S	S	S	S
NITROXOLIN	NTX	S	S	S	S	R	R	S
LEVOFLOXACIN	LEV	R	R	R	S	R	R	R
LINEZOLID	LNZ	S	S	S	S	S	S	S
TEICOPLANIN	TEC	R	R	R	R	R	R	R
AMOXICILLINE	AML	S	S	S	S	R	S	S

La souche plus résistante à la majorité des antibiotiques est la *Lactobacillus plantarum* (NSC10) (résistance à 20 antibiotique sur 25 testés), la souche plus sensible aux antibiotiques est *Lactobacillus brevis*(CHTD27) (sensible à 19 antibiotiques sur 25 testés).

Les bactéries BH14 et CHV14 qui sont résistantes à 14 antibiotiques, les souches JUM4 et NSC5C sont sensibles à 15 et 16 antibiotiques respectivement sur un total de 25.

Toutes les souches sont sensibles à 04 antibiotiques (Linezolid, Cefoperazone, Pristinamycin et Chloramphenicol) et sont toutes résistantes à 05 antibiotiques (Gentamicin, Amikacin, Clindamycin, Colistin , Teicoplanin)

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al., 2008**).

Certaines souches de *Lactobacillus brevis* sont sensibles aux inhibiteurs de la synthèse protéique dont le chloramphénicol et l'érythromycine (**Temmerman et al., 2003; Coppola et al., 2005; D'aimmo et al., 2007**), aux β -lactamines (inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne) comme l'ampicilline et la pénicilline (**Charteris et al., 1998b ; Ammor et al., 2007 ; Khöll et al., 2008**).

La résistance de *Lactobacillus plantarum* (**Ammor et al., 2008 ; Casodo Munoz et al., 2014**) et *Lactobacillus brevis* (**Fukao et al., 2012**) aux antibiotiques s'est révélée principalement intrinsèque et portée par des gènes chromosomiques non transférables entre les bactéries.

Mikelsaar et al. (2004), ont rapporté que des souches de *Lactobacillus* étudiées ont présenté une résistance de 100% à l'Amikacin et à la Gentamicine, Mathur et Singh (2005) ont effectué les mêmes observations soutenant ainsi les résultats que nous avons obtenus

Les Lactobacilles sont résistants à la famille des β -lactamines , Cette résistance a été démontrée dans des études publiées (**Swenson et al., 1990 ; Charteris et al., 1998b ; Delgado et al., 2005 ; Florez et al., 2005**) et présente un caractère intrinsèque (**Coppola et al., 2005, Ammor et al., 2008**). La résistance des lactobacilles aux antibiotiques appartenant à la famille des aminosides (**Kanamycin**) et aux macrolides (Erythromycine et Pristinamycine) a également été étudié par plusieurs chercheurs (**Coppola et al., 2005 et Herreros et al., (2005)**) de même que pour les aminosides et les macrolides; par (**Klare et al., 2007 ; Belletti et al., 2009 ; Toomey et al., 2010 ; Kastner et al., (2006)**).

Résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogène :

Nous avons testé la résistance des six souches pathogènes vis-à-vis de 19 antibiotiques.

Le résultat obtenu dans le **Tableau 8** :

Tableau 8 : Résultat de l'antibiogramme des Souche pathogène.

Souche Antibiotique	SA1	SA2	SA3	SA4	S1	S2
LEV	S	S	S	S	S	S
CFP	S	S	S	S	R	S
NTX	S	S	S	S	S	R
AK	S	S	S	R	S	S
TOB	S	S	S	R	S	S
C	S	S	S	S	R	R
P	R	R	R	R	S	R
OX	R	R	R	R	S	R
TEC	R	R	R	S	S	R
PT	S	R	R	S	S	R
E	S	R	R	R	S	R
CFM	R	S	S	S	S	R
CS	R	S	R	R	R	R
K	S	S	S	R	S	R
KZ	R	S	R	S	S	R
CAZ	R	S	S	R	S	S
FOX	R	S	R	S	S	R
LNZ	S	R	R	S	S	R
FEP	R	S	S	R	R	R

SA1 (Bacillus cereus) , SA3 (Salmonella typhi) , S1 (Staphylococcus aureus)

SA2(E.coli) , SA4 (Listeria monocytogenèse), S2 (Pseudomonas auregenesa)

Après avoir mesuré le diamètre des zones d'inhibition obtenues, nous avons observé que la souche S2 est la plus résistante aux antibiotiques testés contrairement à la souche S1 qui est la plus sensible, les autres souches montrent des résistances variables : résistance aux béta lactamine (*pénicilline – oxacilline*) La résistance aux β -lactamines repose essentiellement sur la synthèse de béta lactamases plasmidiques généralement sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (**Maurin et al., 1995**). Et la majorité des souches est fortement inhibée par cette famille d'antibiotiques (**Chloramphé Nicol, Amikacin, Cefoperazone**).

Nous avons également observé que toutes les souches sont sensibles aux quinolones.

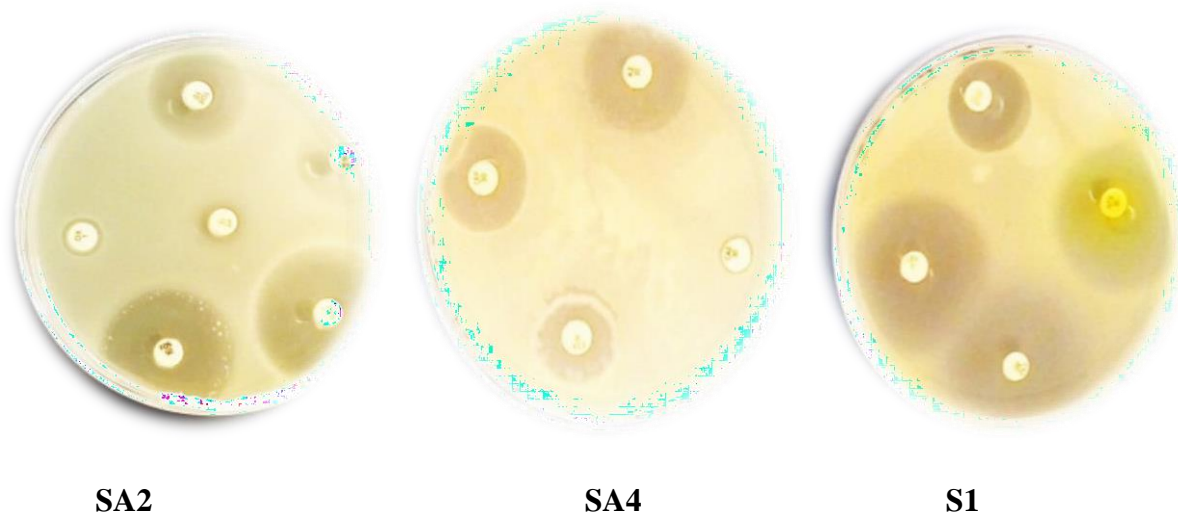


Figure 9 : Résultats des antibiogrammes de quelques souches pathogènes.

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques en milieu liquide : (Mims et al., 1993)

Après 24 heures de culture à 37°C Walsh et al. (2003). Nous avons observé la présence de trouble (la croissance) dans tous le micro tube de la micro plaque pour les deux antibiotique gentamycine et pénicilline donc cette croissance Départ pour plusieurs raisons notamment la présence de contamination au laboratoire, en particulier dans l'incubateur ou la résistance bactérienne à ces des antibiotiques.



Figure 10 : Résultat détermination de la CMI de souche de Lb par méthode de dilution en milieu liquide.

Mise en évidence de l'activité antibactérienne

IV.5. 1. Test des spots :

Nous avons testé l'antagonisme des 07 souches lactiques contre les souches pathogènes de notre collection dont l'activité a été choisie contre les six souches pathogènes , nous observant les résultats d'interaction obtenus par présence de halos clairs autour des disques imbibés de pré-cultures de souches lactiques [**Mme Bey Faiza....al ., (2009)]**

Le résultat total obtenu est dans le **Tableau (9)**

Tableau9 : Résultat des interactions bactériennes.

Souche	BH14	CHV14	NSC10	NSCA	CHTD27	NSC5C	JUM4
SA1	1	0	06	14	11	15	0
SA2	11	0	0	14	0	0	0
SA3	08	0	0	14	0	0	0
SA4	12	0	15	11	11	1	0

S1	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
S2	09	0	1	1	11	11	0

Les souches **S2**(*Pseudomonas auregenes*) , **SA2**(*E.coli*) , et **SA3**(*Salmonella typhi*) ont été inhibées par tous les *lactobacillus* testées contrairement aux les deux souche **SA1**(*Bacillus cereus*) et **SA4**(*Listeria monocytogenèse*) qui ont été les plus résistantes, aucun croissance n’a été remarquée pour la souche **S** (*Staphylococcus aureus*).

Les deux souches *lactobacillus plantarum* (BH14) et (NSCA) montrent une activité importante sur la majorité des bactéries pathogènes. Les autres souches de bactéries lactiques provoquent des inhibitions variables mais les deux souches lactiques (JUM4 et CHV14) Presque inexistant d’inhibition des bactéries pathogènes.

Globalement, l’activité antimicrobienne est dans notre travail reste assez importante nos résultats convergent vers de nombreux travaux indiquant les effets inhibiteurs des *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* contre des germes pathogènes résistants aux antibiotiques (Benmechernene et al., 2013 ; Kermanshahiet al., 2014 et Chang et al., 2016).

D’après les résultats que nous avons obtenus, les souches lactiques étudiées ont une activité antibactérienne à l’égard de *listeria monocytogénese* et *Bacillus cereus*. Cette activité serait probablement due à la synergie entre les différents métabolites : la production d’acides organiques. En effet, les lactobacilles sont connus pour avoir une grande résistance aux pH acides contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles (Adams et al., 1988 ; Wong et Chen, 1988 ; Benthin et Villadsen, 1995 ; Podolak et al., 1996 ; Wilson et al., 2005), le diacétyle, le peroxyde d’hydrogène les lactobacilles produisent également d’autres substances inhibitrices telles que les bactériocines (Schillinger et al., 1996 ; Aslam et Qazi., 2010 ; Ammor et al.,2006; Moreno et al., 2000 ; Navarro et al.,

2000 ; Rodriguez et al., 2002 ;Maldonado et al., 2003 ; Todorov et Dicks., 2005 ; Guessas et al., 2005).

2.La méthode des puits :

Après incubation à 37°C pendant 24h. L’effet antibactérien du surnageant de culture des lactobacilles est suivie par la mesure des diamètres d’inhibition entourant les puits.

Les résultats sont indiqués dans le **Tableau(10)**

Tableau 10 : Résultat de la recherche sur la nature de l’agent inhibiteur

	BH14	CHV14	NSC10	NSCA	CHTD27	NSC5C	JUM4
SA1	0	0	1	0	12	13	0
SA2	1	0	16	11	12	0	0
SA3	0	0	13	0	0	0	0
SA4	14	0	19	16	17	1	0
S1	0	14	0	0	0	0	12
S2	0	0	15	1	12	15	0

Nous avons constaté une activité antibactérienne des surnageants des souches lactiques sur la plupart des souches pathogènes, En effet, les diamètres des zones d'inhibitions étaient compris entre 10-19 mm.

Ce criblage a été réalisé vis-à-vis des germes pathogènes à Gram négatif *Escherichia coli* (Ces résultats se rapprochent notamment de ceux obtenus par **Allouche et al. (2010)**) et *Listeria monocytogenese* Cette activité inhibitrice se traduit par l’apparition d’un halo clair d’inhibition autour des isolats ensemencés en touches. Un exemple de résultats obtenus est représenté dans la figure (11).

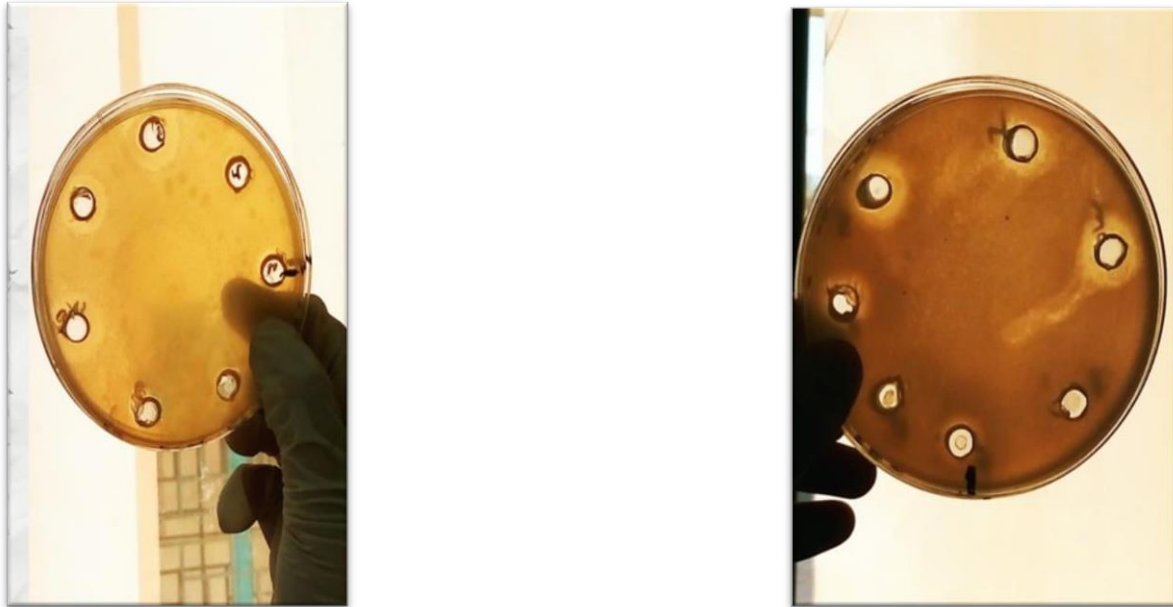


Figure 11 : Résultats d'inhibition des bactéries pathogènes (SA4 et SA2) par les bactéries lactiques.

La fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien, ce qui confirme la production d'agent antimicrobien par les souches lactiques dans le milieu. Plusieurs études ont montré que la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (Metlef et Bouras, 2009).

Annuk *et al.* (2002), Fernandez *et al.* (2002) et Mami *et al.* (2010) dans leurs études, démontrent clairement que plusieurs espèces de lactobacilles, sont largement efficaces concernant l'inhibition des microorganismes pathogènes.

Messi *et al.* (2001) ont rapporté les *Lactobacillus plantarum* pouvaient produire des bactériocines, De même, Lash (2005) et Millette *et al.* (2007) ont décrit une bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* qui inhibait *S.aureus*, *E. coli*, et *P.aeruginosa*. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont montré que les bactéries à effet probiotique sont capables d'empêcher la croissance des bactéries pathogènes *in vivo* et *in vitro* (Lin *et al.*, 2007; Mahdhi *et al.*, 2010).

Identification moléculaire

Les résultats d'identification obtenus par les galeries le séquençage du gène 16S sont indiqués dans le tableau 2. L'alignement et l'homologie des séquences amplifiées par PCR ont été effectués sur le site Web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant BLAST

Software, qui détermine l'identité des 3 souches *NSC5c*, *JUMIII4* et *NSC10* au taxon *Lactobacillus plantarum*. L'arbre phylogénétique est représenté sur la figure 1.

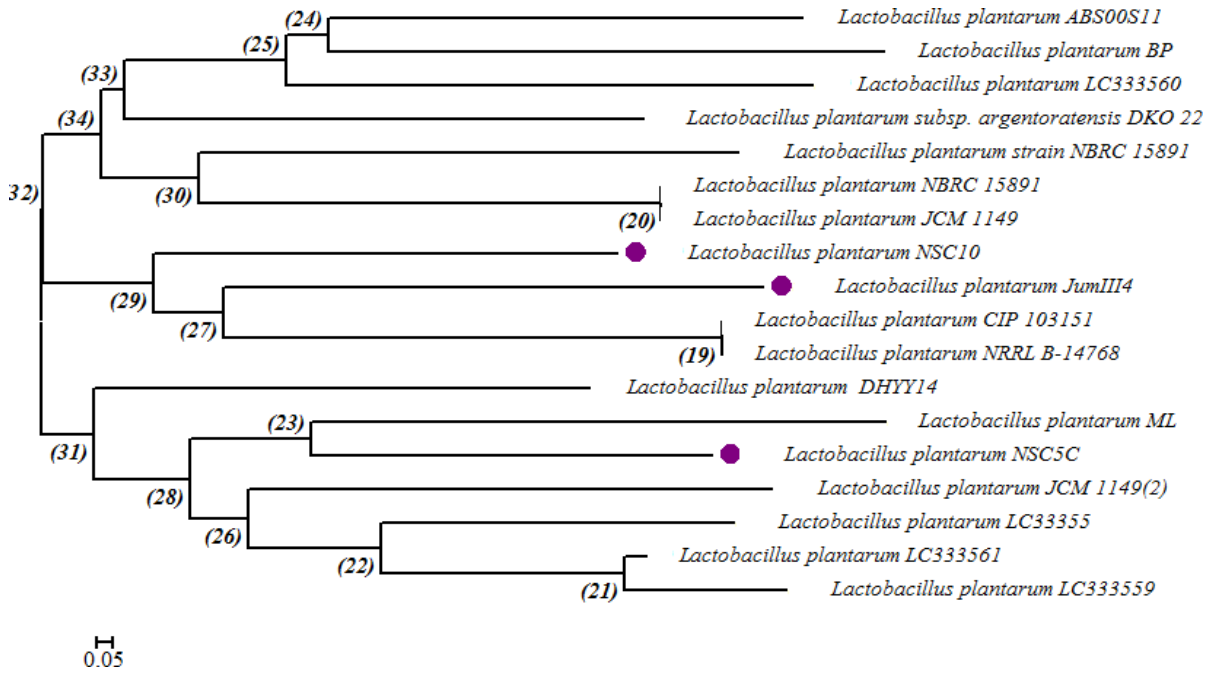


Figure 12 : Résultat de L'arbre phylogénétique des trois lactobacilles identifiés.

Tableau 11 : Pourcentages d'identification des souches sélectionnées à l'aide de méthodes moléculaires et biochimiques

Les souches	Les taxons	% par identification moléculaire	Origines
NSC5C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	Lait de chamelle de Naama, Algérie.
NSC10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	Lait de chamelle de Naama, Algérie.
JUMIII4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	Lait de jument de Saida, Algérie.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

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 : *NSC10* et *BH14*.

Les souches les plus sensibles d'entre elles sont : *NSC5C* et *CHTD27*.

En ce qui concerne la deuxième expérience que nous avons menée pour étudier l'effet antagoniste des sept souches de bactéries lactiques (*NSCA1*, *NSC10*, *JUM04*, *BH14*, *CHV14* et *CHTD27*) sur les six souches pathogènes. (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listéria monocytogenese*, *Salmonella typhi* *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*)

La recherche de l'effet antagoniste dans les surnageant de cultures révèle que l'ensemble des lactobacilles présentent une activité inhibitrice extracellulaire vis-à-vis des souches pathogènes testées. Le meilleur résultat a été observé chez les souches *NSCA*, *NSC10* et *CHTD27* vis-à-vis de *SA4* (*L.monocytogenese*).

Nous avons également confirmé la validité du discours selon lequel les bactéries lactiques jouent le rôle de probiotiques en raison de leur résistance en milieu acide et en présence de sels biliaires.

Nous avons également confirmé l'identification des souches au taxon de *Lactobacillus plantarum* par le séquençage du gène de l'ARN 16S avec un pourcentage de plus de 90%.

L'objectif principal de ce travail était la découvrir l'antibiorésistance chez les bactéries lactique génétiquement et biologiquement c'est ce qui été découvert grâce à ces résultats

Pour conclure, notre travail a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives dont :

- La recherche de gènes de résistances chromosomiques.
- La recherche de gènes de résistances plasmidiques.
- Le curage de plasmides portant des gènes de résistance chez les bactéries probiotiques pour éviter, la transmission horizontale des gènes de résistance.

ANNEXE

Annexe 1 : composition de milieu utilisé

1. A)-Composition du milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe) :

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSo ₄	0.25g
Tween 80	1ml
Eau distillé	1000ml

pH = 6.2

Autoclavage : 121° pendant 30min

B)- Composition du milieu LB :

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	10g

Verser tout dans **1000ml** d'eau distillé

Autoclavage : 121° pendant 30min

Annexe 2 :

Coloration de Gram : C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Le principe de cette méthode comme suit :

1. Préparation d'un frottis (Fixation de la culture bactérien sur la lame par chaleur).
2. coloration par le violet de gentiane pendant 1 min.
3. Ajouter du lugol pendant 30 min.
4. décolorer avec une solution alcool 96° et rincer avec l'eau distillée.
5. ajouter la fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes .laver à l'eau.
6. La lame après avoir été rincée et séchée, puis observée au microscope optique généralement à L'objectif x100, Avec l'huile à immersion.
7. pour Les bactéries dit à Gram(+) sont apparaissent en violet et les bactéries à Gram(-) en rose.

Annexe 3 :

Tableaux 3 : les différents disques d'antibiotique utilisé.

Antibiotique	Charge/disque	Famille	Mécanisme d'action
Oxacilline (OX)	1µg	Béta lactamine	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane
Pénicilline G (P)	10µg		
Amoxicilline (AMC)	20µg/10µg		
Céfoxitine (FOX)	30µg		
Ceftazidine (CAZ)	30µg		
Ampicilline (AMP)	10µg		
Céphalosporine (CFP)	30µg		
Céfépime (FEP)	30g		
Céfixime (CFM)	10µg		

Cefsulodin (CFS)	30µg		
Cefazoline (CZ)	30µg		
Ampicilline (AMP)	10µg		
Cefazoline (KZ)	30µg		
Erythromycine (E)	15µg	Macrolide	Inhibition de la synthèse protéique des bactéries
Pristinamycine (PT)	15mg		
Kanamycine (K)	30µg	Aminoside	Inhibition de la synthèse protéique des bactéries
Tobramycine (TOB)	10µg		
Gentamycine (CN)	10µg		
Amikacin (AK)	30µg		

Nitroxoline (NTX)	30µg	Quinolone	Inhibition de la synthèse de l'acide folique
Levofloxacin (LEV)	5µg		
Linezolid (LNZ)	30µg	oxazolidinones	Inhibition de la synthèse protéique des bactéries
Colistine (CS)	10µg	Polypeptide	Inhibition de la synthèse de paroi
Fosfomycine (FOS)	50µg	Acide phosphonique	inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
Chloramphénicol (C)	30µg	Chloramphénicol	Inhibition de la synthèse protéique des bactéries
Teicoplanine (TEC)	4 mg	Glycopeptide	inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne

Tableau 12 : Résultat de test l'antibiogramme chez les lactobacillus

Souche \ Antibiotique	NSC5C	CHTD27	NSCA	BH14	CHV14	NSC10	JUM4
FEP	3.5	2.9	2.7	0	3.5	0	2.5
E	2.9	2.4	2.2	1.7	2.5	1.3	2.2
C	3.5	3.2	2.9	2.1	3.8	2.4	3.2
CFP	2.5	2.2	1.9	0.9	1.3	0	0

P	1.9	1.8	1.4	0	0	0	0
CN	1	0	0	0	0	0	0
PT	3.2	3.2	2.9	3.2	4	2.6	3.4
FOS	0	0	0	0	0	1.4	0
CFM	3	2.9	2.4	1.6	3.5	0	3
OX	0	0	0	0.9	1.8	0	1.3
TOB	1.3	1.9	0	0	0	0	0.7
AK	0	0	0	0	0	0	0
CD	1	0	1.1	1.5	0	0.6	0.9
CS	0	0	0	0	0	0	0
AMC	3	1.9	2.8	2.3	0	3.8	2.9
AMP	2.9	2.7	2.7	1.8	3	1.4	2.2
KZ	2	2.8	2.1	2	2.8	2.3	2.1
FOX	1.5	1.7	1.7	0	2.6	2.5	1.7
CAZ	2.1	2.9	2.8	1.5	3.8	1.2	2.2
CFP	1.6	2.3	2	2.5	2.5	2.9	2
NTX	1.7	2	1.6	2	1.4	1	1.6
LEV	1.1	1.3	1	2.8	1	1	1.3
LNZ	3.3	3.7	3.2	4.5	2.6	2.5	2.8
TEC	0	0	0	0	0	1.4	0
AML	3.3	2.2	3.7	2.9	0	4.6	3
K	0	3.5	0	1.2	0	1	0

Tableau 13 : Résultat de teste l'antibiogramme chez les souches pathogènes

Souche Antibiotique	SA1	SA2	SA3	SA4	S1	S2
P	0	0	0	1	2.3	0
E	3.1	0	0	0	4.3	0
FEP	0	2.8	2.3	0	0	0.8
C	2.5	3.2	2.3	2.7	0	1
OX	0	0.8	0	0.9	2.1	0
PT	2.9	1	0	2.2	3.5	0
AK	2.2	2.3	2.2	1.5	2.3	2.1
CFM	0	3.4	2.1	1.9	2.5	0
CS	0	1.7	1.5	0	1.1	1.3
K	2	2.6	2.2	0	2.5	0
KZ	0	2.4	1.3	2.1	1.6	0
CAZ	0	3.2	2.6	0.7	1.7	1.8
FOX	1	3.1	0	1.7	3.6	0
CFP	1.8	3.3	3	2.2	0	1.8
NTX	3.1	3	2.2	2.4	3.3	1
LEV	2.9	4.3	3.7	2.4	3.5	2.6
LNZ	3.4	1.5	1.2	3.3	3.7	0.8
TEC	1.5	0.9	0.8	1.9	2	0.8

Annexe 4 : Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Autoclave
- Bain Marie
- Balance
- Centrifugeuse électrique
- Compteur de colonies
- Etuves
- Four Pasteur
- Micropipettes (Microlite) ;
- Microscope optique (Motic) ;
- pH mètre
- Réfrigérateur
- Vortex électrique
- Spectrophotomètre

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aarestrup F.M. (1999).** Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J.Antimicrob.Agents.* (12):279-285
- ABID A. (2015)** . Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien «Jben». diplôme de Master . Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.1 – 52.
- ABID Z. (2015).** Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives «AMOREDJ» fermentés. diplôme de magister . université d'Oran 1 Ahmed ben Bella.
- Ahlem A. (2012).** *Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait.* diplôme de Magister. Université Ferhat Abbas- Setif.1 - 6.
- Ali Zineddine B. (2010).** Identification et caractérisation technologique et fonctionnelle des souches *Lactobacillus plantarum* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle. diplôme de Master. Université D'Oran.1- 150.
- Allend A., Martinez B., Selmaa V., Gila M.I., Suarezb J.E et Rodriuez A. (2007).** Growth and bacteriocin production by Lactic Acid Bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.* 24 : 759 - 766.
- Allouche F.N., Hellal A., Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de *Lactobacilles thermophiles* utilisé dans l'industrie. *Nature et technologie.* 13- 20.
- AMARA S. (2012).** Effets Probiotiques des Bactéries lactiques sur le poulet de chair. Diplôme magister. Université d'Oran. 1 - 287.
- Amaria H. (2010).** Etude de l'antibiorésistance chez 83 souches autochtones de bactérie lactique . Diplôme de magister .Université d'Oran.1 – 89.
- Amaria H. (2013).** Recherche des bactéries lactique productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes . Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en biologie . Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen.
- Ammor M.S., Florez A.B et Mayo B. (2007).** Antibiotic resistance in non-*enterococcal* lactic acid bacteria and *bifidobacteria*. *Food. Microbiol.* 24:559 - 570.
- Ammor S., Florez A.B., Van Hoek A.H.A.M., De Los Reyes-Gavilan C.G., Aarts Henk J.M., Margolles A., et Mayo B. (2008).** Molecular characterization of intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Mol. Microbiol Biotechnol.* (14):6 - 15.
- Ammor M.S., Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76 : 138 - 146.
- Andersson R. (1986).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J.Food Microbiol.*

(3):149 - 160.

Annuk H.S., Shchepetova J., Kullisaar T., Songisepp E., Zilmer M, Mikelsaar M. (2002).

Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidate. *J. Appl. Microbiol.*(94):402 - 412.

Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. l;Food Microbiol. (111):234 - 240.*

Axelsson L. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria.

Salminen S. and von Wright A. Marcel Dekker Inc. New York. 1 - 63.

B

Belletti N., Gatti M., Bottari B., Neviani E., Tabanelli G., et Gardini F. (2009). Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian Hard Cheeses. *Journal of Food Protection*, 72(10):2162-2169.

BENABBOU T.A. (2012). Antibiorésistance de bactérie lactique isolée pour produits artisanaux algériens. diplôme de magister. Université d'Oran .121

Benmechernene Z., H.F., Chentouf B., Yahiab F., Ghazi M., Quintela-Baluja J., Calo-Mata and Barros-Velázquez J. (2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostocmesenteroide* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *Bio Med Researd International. V(2013), Article ID 418132 : 14.*

BENSIDHOUM K., BOUDRAHEM N. (2017). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* à partir des produits laitiers traditionnels artisanaux. diplôme de master. Université A.MIRA-Bejaia.

Bergy's manual. (2009). Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the fermicutes. Edition springer

Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and.

Bogovic-Matijasic B., et ROGELJ I., (1998). Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221, production studies in MRS-media at different pH- values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC15009. *Process in Biochemistry. 33: 345-352*

Botes M., Van Reenen C.A., Et Dicks L.M.T. (2008). Evaluation of *enterococcus mundtii* st4sa and *lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *Int. J. Food microbiol. (128) : 362-370.*

Boukhatem L. (2013). Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen . diplôme de master .Université Aboubekr Belkaid Tlemcen .

BOUMEHIRA A.Z. (2010). Identification et caractérisation technologique et fonctionnelle des souches *lactobacillus plantarum* isolées des laits cru de chèvre et de chamelle . diplôme de magister . Université d'Oran.

Bourel G., Henini S., Krantar K., Oraby M., Divies C., Garmyn D. (2001). Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *INRA EDP Sciences*. 75-82.

By F. (2009). Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactobacillus* sp. et quelques souches d'entérobactéries. diplôme de Magister . Université d'Oran Es-Senia. 172.

C

Cannon J.P., Lee TA Bolanos J.T., Danziger L.H. (2005). Pathogenic relevance of *Lactobacillus* : a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin microbiol infect Dis.* (24) : 31 - 40.

Caplice E., Fitzgerald G.F. (1999). Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 50(1): 131-149

Casado Muñoz M., Benomar N., Lavilla L., Lerma L., Gálvez A., et Abriouel H. (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology.* (172): 110118.

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

Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collis J.K. (2001). Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic *lactobacilli*. *Journal of Food Protection.* (64): 2007-2014.

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

Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., and Collins J.K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journ Appl Microbiol.*(84): 759 – 768.

Chen H., et Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety.* (2): 82–100.

Chomczynski P., and Sacchi N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry.* 162: 156-159.

Chopra I., Hodgson J., Metcalf B., et Poste G. (1998). The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 41: 497-503

Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.* (71): 1 – 20.

Coppola R., Succi M., Tremonte., Reale P., Salzaano G., et Sorrentino E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait.* 85 : 193-234.

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

D

D'aimmo M.R., Modesto M et Biavati B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* isolated from dairy and Pharmaceutical products. *Int. J. Food.Microbiol.* (115): 35 - 42.

DA CRUZ AG., FARIA JAF., VAN DENDER AGF. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res. Int.* 40: 725 - 732.

Danielsen M. and Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82(1) : 1–11

Davidson B.E., Kordias N., Dobos., et Hillier A.J. (1996). Genomic organization of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 70(2-4) : 161 - 183.

Davies J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes . *Science.*264: 375 – 382.

Davies I. (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In Antibiotic Resistance: Origins ,Evolution, Selection and spread: Chadwick, D. J., Goode, J. (Eds.). CIBA Foundation Symposium. *Wiley Chichester .* (207): 15 - 27.

de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits. Tec & Doc. Lavoisier (Paris).

De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960). A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacterio.* 23(1): 130 - 135.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou

Dicks L.M.T, et Botes M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro- intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes.* 1(1): 11 – 29.

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

E

Euzeby P. (2007). Abrégé de bactériologie Générale et Médicale .

<http://www.bactériologie.net/generale/resistancenaturelle.html>.

F

FAO/OMS. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .*Working Group Report.* Cordoba, Argentina.

FAO/OMS. (2001). Consultation mixte D'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments , y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes Cordoba, Argentine.

FAO/OMS. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in foods: report of a joint FAO/WHO

working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.1 - 11.

Fernandez F., Shridas P., Jiang S., Aebi M., Waechter C.J. (2002). Expression and characterization of a human cDNA that complements the temperature-sensitive defect in dolichol kinase activity in the yeast sec59-1 mutant: the enzymatic phosphorylation of dolichol and diacylglycerol are catalyzed by separate CTP-mediated kinase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology*. 12(9): 555 - 62

Flandrois J.C., Courcol R., Lemeland J.F., Ramuz M., Sirot J et Soussy C.J. (1997). Bactériologie médicale. Presses Universitaire de Lyon. ISBN.176 – 180.

Fleming H.P., J.L Etchells., and R.N Coslilow. (1975). Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 1040 - 1042.

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

Fukao M., Yajima N. (2012). Assessment of Antibiotic Resistance in Probiotic *Lactobacilli*, Antibiotic Resistant Bacteria- A Continuous Challenge in New York. Pana(Ed). 503-512.

Fuller R. (1989). A review: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* (66), :365-378. *Gastroenterol.* 17: 741-754.

G

Gibson C.W., Thomson N.H., Abrams W.R., Kirkham J. (2005). Nested genes: biological implications and use of AFM for analysis. *Gene*. 350(1):15-23.

GROSU-TUDOR S.S., STANCU M.M., PELINESCU D., and ZAMFIR M. (2014). Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *World J Microbiol Biotechnol.* (30):2459–2469.

Guessas B., M. Hadadji N., Saidi., et Kihal M. (2005). Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by lactic acid bacteria in milk. *Dirasat. Agruic. Sci.* 32(3): 304-312.

Guiraud J.P et Rosec J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor. 237 - 251.

H

Hadjer B., Cheuaiba D. (2015). Etude de l'activité antimicrobienne des quelques souches *lactobacilles* isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis des quelques souches pathogènes ciblées. diplôme de Master Académique. Université Kasdi Merbah Ouargla.1 – 48.

Hamilton-Miller J.M.T., Shah S. (1998). Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of *lactobacilli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 153 – 154.

Hansal N. (2015). Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre. diplôme de

magister. Université d'Oran 1 Ahmed ben Bella.

Hardie J.M., R.A Whiley.(1997). «Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus .» *J Appl Microbiol Symposium Supplement.* (83): 1-11.

Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., et Djilali B. (2009). Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieu a base des extraits de caroube, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., Congrès international BIOMED 1 Marrakech.* 37 – 55.

Hayet M. (2013). Protéolyse et autolyse de souches de *lactobacilles* d'origine laitière. Etude de leur aptitude à hydrolyse les caséines et les protéines de poisson. diplôme de magister . Université d'Oran .

Herreros M.A., Sandoval H., Gonzalez I., Castro J.M., Fresno M.E., et Tornadijo M. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Food Microbiol.*22: 455-459.

inhibition of enteropathogen-cell interactions, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 4121-4128.

Hoover D.G., et Chen H. (2005). Bacteriocins with Potential for Use in Foods. Antimicrobials in Food. Third Edition. CRC Press.

I

Ikram H. (2016) . Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français. THÈSE en cotutelle. l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah. Français. *Rev. Chimie analytique.*1 - 132.

Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A.C. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Rev Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 18(2): 299 - 313.

J

Joerger M.C., Klaenhammer T.R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol.* 167(2): 439 - 446.

Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud M.J et Boquien C.Y. (1987). Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le lait.* 67 : 149 - 172.

K

Kafia B., Loubna F. (2013). Activité antibactérienne de *Lc. Lactis* et *Lb. plantarum* à l'égard de *S. aureus* contaminant du fromage de chèvre conservé dans le lactosérum. Diplôme de Master. Université Abderrahmane mira de Bejaia.1 – 48.

Kandler O., et Weiss N. (1986). genus *lactobacillus*. In: Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Université d'Oran. 1-

156.

Kandler O., Weiss N. (1986). *Lactobacillus*. In *Biology of Microorganisms on Grapes , in Must and in Wine* ,konig H.et Frohlich J.(2009) Springer ed, Allemagne. 3 - 29.

Karam N.E., et Karam H. (1994). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques de laits crus d'algérie. In *Alimentation, Génétique et Santé de l'enfant* .Ed.Desjeux, J.F.et Touhami M, L'harmattan. 257 – 264.

Karima B. (2012). Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Diplôme Magister. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.1 – 52.

Kastner S., Perreten V., Bleuler H., Hugenschmidt G., Lacroix C., et Meile L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used food. *Syst. Appl. Microbiol.* 29(2): 145 - 155.

Keltoum B., Nedjma B. (2017). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* à partir des produits laitiers traditionnels artisanaux. diplôme de master.Université A. MIRA-Bejaia .

Kermanshahi R.K., L Goudarzi., and Z Savinezhad. (2014). Antimicrobial activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* bacteria against *Proteus* species. *Advances in Environmental Biology*.8: 1567-1572.

Khöll P.R., Mandar R.H., Marcotte H., Leibur E., Mikelsaar M.H., Ammarstrom L. (2008).Characterization of oral *Lactobacilli* as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol.Immunol*.23: 139-147.

Kihal M., Prevost H., Lhotte M.E., Huang D.Q., et Divies C. (1996). Instability of plasmid-encode citrate permease in *Leuconostoc*.*J.Appl.Microbiol.*(22) : 219-223

Klaenhammer TR . (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 12(1-3): 39-85.

Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerhoven V., Kahlmeter G., Hildebrandt B., Muller-Bertling S., White W., et Gossens H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*,*Pediococcus* and *Lactococcus* human isolated and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* (59): 900-912.

Koo O.K., S.M. Kim., and S.H Kang. (2015). Antimicrobial potential of *Leuconostoc* species against E.coli O157: H7 in ground meat. *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry.* (58): 831-838.

L

Lamia B., Assia B. (2016). Slection de souches de bactéries lactiques isolées de l'ben traditionnel à propriétés Probiotiques. diplôme de Master. Université A.MIRA-Bjaia. 1 -110.

Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons, New York . 115-175

Lash B.W., T.H. Mysliwiec., and H. Gourama. (2005). Detection and partial characterization of a

broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiol.*22:199-204.

Lavigne J.P. (2007). Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.

Lechardeur D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., et al. (2011). Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 143 – 149.

Leroi F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food*

Levy S.B. (1992). The Antibiotic Paradox :How Miracle Drugs are Destroying the Miracle.Plenum Press.New York.

Levy S.B., Marshall B. (2004). Antibacterial resistance world wide:causes, challenges and reponses.Nat.Med. Rev.10: S122 – S129.

Louiza B. (2013). Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen. diplôme de Master . Université Aboubekr Belkaid Tlemcen .I – 56.

Lucie M. (2016). Antibiotiques et résistances : enquête sur les et les comportements du grand public . le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine. 5- 7.

Luquet F.M. (1994). Lait et produits laitiers, vers E1/Tec et Doc. Lavoisier.Paris. *microbiology* 27: 698 – 709.

M

C.C. Marshall., F.G. Halasz., R.A. Rogers., and W.C. Janssen Jr. (1991). Aquanet: a hypertext tool to hold your knowledge in place. *Proceedings of the third annual ACM conference on Hypertext.* 261 – 275.

E.J Miller and G.V Gwynne . (1972). A Life Apart: A Pilot Study of Residential Institutions for the Physically Handicapped and the Young Chronic Sick, Tavistock Publications, London. 240 .

Mahdhi A., Harbi B., Angeles Esteban M., Chaieb K., Kamoun F., et Bakhrouf A. (2010).Using mixture design construct consortia of potential probiotic Bacillus strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*. *Biocontrol Sci Techn.* 20: 983- 996.

Makhloufi K.M. (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv).

Maldonado A., Ruiz-Barba J.L., et Jinénez-Diaz R. (2003).Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1) :383 - 389.

Mami A.,Hamedi A., Henni J., Kerfouf A., Kihal M. (2010). Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.*LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE . (5) : 21*

Mann G.V., Spoerry A. (1974). Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels.

Technologie de production. *Am. J Clin. Nutr.*(61) : 353-359. 23.

Maragkoudakis P.A., Chingwaru W., Gradisnik L., Tsakalidou E., Cencic A. (2010). Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *Int . J.Food Microbiol.* (1): S91 - 7.

Maragkoudakis P.A., Mountzouris K.C., Rosu C., Zoumpopoulou G., Papadimitriou K., Dalaka E., et al. (2010). Feed supplementation of *Lactobacillus plantarum* PCA 236 modulates gut microbiota and milk fatty acid composition in dairy goats: a preliminary study. *Int .J.Food Microbiol.* . (141): S109-S116.

Marshall-Carlson L., Neigeborn L, Coons D., Bisson L., Carlson M. (1991). Dominant and recessive suppressors that restore glucose transport in a yeast *snf3* mutant. *Genetics . J. Article: Research Support, Non-U.S. Gov't | Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.* 128(3): 505 - 12

Mathur S, Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int. J. Food. Microbiol.*(105): 281–295.

Mayra – Makinen A., Bigret M. (2004). Industrial Und Production of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria:Microbiological and Functional Aspects.*3 rd. ed. Salminen S., A Wright., and A.Ouwehand. *Marcel Dekker, inc., New York.* 175 – 198.

Messi P., M Bondi., C Sabia., R Battini., and G Manicardi. (2001). Detection and preliminary characterization of bacteriocin (plantaricin 35d) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Int.J.Food. Microbiol.*(64): 193-198.

métabolites .In :thèse présentée à l'INRS-Instituent Armand-Frappier.

Mikelsaar M., MaNdar R., Sepp E., et Annuk H. (2004). Human Lactic Acid Microflora and Its Role in Welfare of the Host.in *Lactic acid bacteria, Micobiological and Functional Aspect.* Third Edition. Marcel Dekker.

Miller ., Richard W., Olshavsky., and John A. (1972). Consumer Expectations, Product Performance, and Perceived Product Quality. *Journal of Marketing Research.* 9(1) : 19 - 21

Millette M., C Dupont., F Shareck., M.T Ruiz., D Archambault., and M Lacroix. (2007). Purification and identification of the Pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology.*

Mohankumar A., and N Murugalatha. (2011). Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. *International Journal of Biology .*(3): 128-143.

Molin G., Klarin B., Wullt M., Palmquist I., Larsson A., Jeppsson B. (2008). *Lactobacillus plantarum* 299v reduces colonisation of *Clostridium difficile* in critically ill patients treated with antibiotics. *Acta Anaesthesiol Scand.* 52(8):1096-102.

Moraes M. P., PERIN L. M., ORTOLANI M. B. T., YAMAZI A. K., VIÇOSA G. N., NERO L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Sci. Technol.* **43**: 1320-1324.

Morelli L., Vogensen F.K., et Wright A. (2004). Genetics of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects* 3rd Ed. Salminen S., Wright A., et Ouwehand A. *Marcel Dekker Inc. New York.* 249 – 293.

Moreno I., Learyer A.L.S., et Leitao M.F. (2000a). Detection and characterization of bacteriocins producing of *Lactococcus lactis* strains. *Braz.J.Microbio.*(31): 184-192

Muriana P.M., Klaenhammer T.R. (1991b). Cloning, phenotypic expression and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J Bacterio.* 173(1): 1779 – 1788.

P.M Muriana., and T.R Klaenhammer. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl Environ Microbiol.* 53: 553 – 560.

N

N. Nilius., T. M. Wallis., and W. Ho., J. Chem. (2002). Phys. 117 : 10947.

Nabila H. (2015). isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre . diplôme de magister .Université d'Oran 1 Ahmed ben Bella.

Navarro L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F., et Torres C. (2000). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.*(88) :44-51.

Nilius A.M., et Ma Z. (2002). Ketolides: the future of microlides ? Current Opinion in pharmacology. 2 :1 - 8

Normark B.H., Normark S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* . (252): 91 – 106.

Noura R., Meriem G. (2017) . L'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir des selles d'enfants. diplôme de Master. Université de Khemis-Miliana .1 – 56.

O

Ouaba L.I.I., Lei V., Jensen L.B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials. Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. Food. Microbiol.* (121): 217-224.

Ouwehand A.C., et Vesterlund S. (2004). 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd ed. *Marcel Dekker, New York.* 375 – 395.

R

Rim EL JENI., Balkiss B.Z., Monia EL BOUR. (2015). CARACTERISATION IN VITRO DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DES POISSONS D'EAUX DOUCES. *Revis Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô. (42) : 2*

Rodriguez J.M., Martinez M.I., et Kok J. (2002). Pediocin PA-1, a wide- spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Cria. Rev.Food.Sci.Nutr. (42): 91-121.*

Royo-Bezares B., Saenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea, et Torres, C. (2006).

Renault P. (2008). Génétique des bactéries lactiques. In bactéries lactiques : de la génétique aux ferments.ed. Corrieu G., et Luquet F.M.Tec & Doc, Lavoisier, Paris.153 – 269.

S

Salminen S., Gorbach S., Yuan- Kun L., (2004). Human studies on probiotics : What is scientifically proven today? In Lactic Acid bacteria :Microbiologicaland functional Aspects . Eds salimes S.,von Wright A., Ouwerhand A. dekker M. *New York.* 515 -530.

Salminen S., A.V WRIGHT., and A OUWEHAND. (2004). Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Edited by Marcel Dekker.

samira B. (2015). Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives «AMOREDJ» fermentés. diplôme de magister .Université d'Oran 1 Ahmed ben Bella.1 – 203.

Sedrati A. (2014). Etude de l'antibiorésistance des souches bactériennes à l' origine des infections infantiles à l'EPH d'Ouargla. Mémoire de MASTER ACADEMIQUE. Université Kasdi Merbah Ouargla.1 -44.

Servin A.L., and Coconnier M.H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin*

Simpson W.J., Hammond J.R.M., et Miller R.B. (1988). Avoparcin and vancomycine – useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria. *J. Appl. Bact.(64): 299 – 309.*

Stiles M.E. (1996). biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek.* 70: 331-345.

STILES et HOLZAPFEL W.H. (1997). Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology.* (36) : 1-29.

SUTRA L., FEDERIGHI M., et JOUVE J. L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : POLYTECHNICA, Paris, France. 308(6) :31-249.

T

- Tabak S., Medouakh L., Adda M., Chekroun A., Krantar K., and Bensoltane A. (2007).** Interaction between *Helicobacter pylori* responsible for diseases gastro- duodenal and *bifidobacteria*. . *Egypt. J. App. Sci.* 22: (12A), 72-83.
- Tamime A. (2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). (Eds), John Wiley and Sons, Inc, New York. 261 - 366.
- Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. (2003).** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food. Microbiol.* (81):1-10.
- Teuber M., Meile L., and Schwarz F. (1999).** Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 76: 115 –137.
- Thompson J., et Gentry-Weeks C.R. (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries Lactiques. In : De Roissart H. et Luquet F.M., Bactéries lactiques. *Lorica, Uriage.* 1 : 239-290.
- Todorov S.D., et Dicks L.M. (2005).** Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *J. Microbiol.* 43(4): 370-4.
- Toomey N., Bolton D., et Fanning S. (2010).** Characterization and transferability of antibiotic genes from lactic acid bacteria from Irish pork and beef abattoirs. *Rev. Microbiol.* (161): 127-135.
- Tremblay S. (2007).** Etude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques. Mémoire de maîtres sciences (M.Se.). Université de Laval. Québec.

V

- Vescovo M., S Torriani., C Orsi., F Macchiarolo., and G Scolari. (1996).** "Application of antimicrobial producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables." *Journal of Applied Bacteriology.* (81): 113–119.
- Von M.J.W., Todorov S.D., et Dicks L.M.T. (2009).** Optimization of growth medium for production of bacteriocins by *Lactobacillus plantarum* JW3BZ and *Lactobacillus fermentum* JW11BZ et JW15BZ isolated from boza. *Trakia Journal of science.*(7): 22 – 33.
- Vos P., et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2009).** New York, NY: Springer-Verlag. 3(2).

W

- Walsh C. (2003).** Natural and produced immunity versus acquired resistance. In Antibiotics : actions, origins, resistance..ed. ASM Press, Washington. 91-106
- Wunwissa K., Bhesb B., et Hilton D. (2003).** Evaluation of encapsulation techniques of Probiotics for yoghurt. *Inter Dairy J.* (13): 3 – 13

Y

- Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar Korich M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Ed Médecine du Maghreb.* 91: 13 – 1

Z

Zahiya B. (2012). Bactéricunes des bacteries lactiqueq : étude biochimique et génétique.These de Magisrer en Biotecnologie.Université D’Oran.1 – 121.

ZEBA B. (2005). Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. UFR-SVT Université de Ouagadougou/ Burkina Faso, 03 Bp 7021 Ouagadougou 03. *African Journal of Biotechnology* .4 (13): 1559 – 1562.