



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج

Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé :

Les espèces *Lactobacillus* spp. d'origine végétale :
Evaluation, *in vitro*, des activités fermentaires et/ ou
bacteriocinogènes.

Présenté par:

Atoui Youcef

Salik Mohammad

Soutenu le 11 / 06/ 2024, Devant le Jury :

	Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
Président :	Dr ZERROUG Amina	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Examineur :	Dr SADRATI Nouari	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadreur :	Dr MERIBAI Abdelmalek	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2023/2024

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude à mes très chers parents, pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué; avec tous les moyens et au prix de toutes les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour le sensé du devoir qu'ils mon enseigné depuis mon enfance. Ils n'ont jamais cessé de m'encourager et de me motiver.

A mes très chers frères: Ayoub et Amine

A mes chères sœurs

A toute ma famille et mes amies

Youcef

*Je dédie ce travail à toutes les personnes qui m'ont encouragé de près
ou de loin pour son accomplissement.*

*A mes cheres parents tout en m'inclinant pour leur témoigner mes
remerciements et ma reconnaissances envers les sacrifices et le
soutien moral qu'ils m'ont fourni pendant toute la durée de mes
études.*

A mes frères et toutes ma famille et mes amies.

Mohammad

Remerciement

Avant tout, nous remercions dieu le tout puissant de nous donné la force, le courage et la volonté, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Dr.Meribai.A, pour nous avoir proposé ce sujet, pour ces conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail.

Nous remercions aussi les membres du jury Dr Zerroug.A et Dr Sadrati.N d'avoir accepter de juger ce travail, c'est un honneur pour nous que d'avoir loccation de discuter nos résultats de recherche avec vous.

Nos sincères remerciements aux Fouad et Maria, chefs de laboratoire de microbiologie FST pour leur aide, leur soutien, et collaboration.

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A vous tous, un grand merci.

Tables des matières :

1.	Introduction	1
2.	Matériels et méthodes	4
2.1.	Matériels	4
2.1.1.	Matériel et milieux de cultures	4
2.1.2.	Matériel biologique	4
2.2	Méthodes	4
2.2.1	Récupération des souches lactiques et des souches cibles	4
2.2.2	Revivification des souches lactiques	5
a.	Revivification des lactobacilles	5
b.	Revivification des lactocoques	5
2.2.3	Isolement et identification des souches cibles	5
2.2.3.1	Enrichissement	5
2.2.3.2	Isolement	6
2.2.3.3	Identification des Caractères Biochimiques des Souches Cibles	6
2.2.4	Purification des Souches Lactiques	7
2.2.5	Caractères Biochimiques, Morphologiques et Culturels des LAB	7
2.2.5.1	Caractères Biochimiques	7
a.	Test Catalase	7
b.	Production de Gaz	7
c.	Fermentation des Sucres	8
d.	Test du Milieu TSI	8
e.	Recherche de l'Oxydase	8
2.2.5.2	Caractères Physiologiques	8
a.	Croissance à Différentes Températures	8
b.	Production de CO ₂ de la Fermentation du Glucose	8
2.2.6	Conservation des Souches	9
2.2.6.1	Conservation à Court Terme	9
2.2.6.2	Conservation à Long Terme	9
2.2.7	Exploration des effets inhibiteurs dirigés contre des souches cibles (SC)	9
a.	Préparation des pré-cultures	9
b.	Méthode de diffusion en milieu solide sur disque (disques imbibés)	9
c.	Estimation du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques	10
2.2.8	Réalisation des antibiogrammes	10
2.2.8.1	Les souches cibles	10
2.2.8.2	Les souches lactiques	11
2.2.9.	Effets de la température et du temps de conservation sur l'activité antibactérienne	12
2.2.10.	Exploration des méthodes d'antagonisme: Comparaison et Évaluation	12
a.	Test sur gélose par points	13
b.	méthode de diffusion de disque	13
c.	Test de diffusion en puits sur gélose	13
3.	Résultats	14
3.1.	La purification des souches lactiques et les souches cibles (SC) :	14
3.1.1.	Isolement et purification des souches cibles	14
3.1.2.	La purification des souches lactiques	14
a.	La Purification des lactobacilles	14
b.	La Purification des lactocoques	14

3.1.3. Etude des caractères morphologiques et cultureux	15
3.1.3.1. Aspect macroscopique des lactobacilles	15
a. Sur milieu solide	15
b. Sur Milieu liquide	15
3.1.3.2. Aspect microscopique	16
a. Observation à l'état frais	16
b. Coloration au bleu de méthylène	16
c. Coloration de Gram	16
3.1.3.3. Test de Catalase et Oxydase	17
3.2. Antagonisme des LAB dirigé contre des souches cibles Gram (+)	17
3.2.1. Antagonisme des Lactobacilles dirigé contre des souches cibles	18
3.2.2. Antagonisme des Lactocoques dirigé contre des souches cibles	19
3.3. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des LAB sélectionnées	21
3.4. Résultats d'antibiogramme	22
3.4.1. Les souches lactiques	22
3.4.2. Les souches cibles	23
3.5. Effets de la température et du temps de stockage sur l'activité Antibactérien	23
3.5.1. Effets de la température	24
3.5.2. Effets de temps de conservation	25
3.6. Exploration des méthodes d'antagonisme : Comparaison et évaluation	26
4. Discussion	28
5. Conclusion	37
Références bibliographiques	
Annexe	

Résumé

L'étude a comme l'objectif, l'évaluation d'impacts des conditions de cryoconservation (deux années à - 80°C) pendant deux années, de tester les effets bacteriocinogènes pour 12 souches lactiques (6 Lactocoques + 6 Lactobacilles), isolées des olives de table d'Algérie. Après leurs revivification, purification, caractérisation et réalisation de leurs profils d'antibiogrammes. L'identification des souches, comme des lactocoques et Lactobacilles, par des méthodes bactériologiques classiques, s'est abolie au niveau des genres, (cause de logistique). L'antagonisme des isolats, conduit *in vitro*, sur milieu bactériologique: Muller Hinton, dirigé contre des souche cibles, à Gram positif et négatif, par trois méthodes différentes : (méthode de diffusion en milieu solide sur disque imbibés, test de diffusion en puits sur gélose, test sur gélose par points), a montré que parmi les souches lactiques: trois isolats (deux lactobacilles et une lactococcie), étaient bacteriocinogènes, avec effet bactéricide dirigé beaucoup plus contre les souches cibles à Gram positifs, avec des zones d'inhibition de 21 mm entre Lb1 et *Staphylococcus aureus*, de 20 mm entre Lb1 et *Enterococcus faecalis*, de 18 mm entre Lc2 et *Staphylococcus epidermidis*. Les isolats Lb1, Lb2 et Lc2, considérées comme souches ayant inhibé (par effet bactéricide) la croissance des souches-cibles à Gram positif. Les Surnageants Brutes Actifs (SBA) des cultures des souches lactiques, après neutralisation, ont montré résistance au chauffage et aux différentes conditions de conservation. La meilleure méthode d'exploration d'antagonisme bactérien, semble celle des puits sur gélose, suivie par la méthode de diffusion par disques imbibés, puis par le test sur gélose par points. Les profils des antibiogrammes ont montré la résistance de 52.7 % des Lactobacilles et de 44.4% des Lactocoques.

Mots clés

Antagonisme, Antibiogramme, Cryoconservation, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, Revivification,

Abstract

The study's objective was to evaluate the impacts of cryopreservation conditions (two years at - 80°C) for two years, to test the bacteriocinogenic effects for 12 lactic strains (6 Lactococcies + 6 Lactobacilli), isolated from olives of Algerian table. After their revivification, purification, characterization and production of their antibiogram profiles. The identification of strains, such as *lactococcus* and *Lactobacillus*, by classic bacteriological methods, has been abolished at the genera level (due to logistics). The Antagonism of isolates, conducted *in vitro*, on bacteriological medium: Muller Hinton, directed against target strains, Gram positive and negative, by three different methods (diffusion method in solid medium on soaked disks, diffusion test in wells on Agar, spot agar test), showed that among the lactic strains: three isolates (two lactobacilli and one lactococcus), were bacteriocinogenic, with bactericidal effect directed much more against the Gram-positive target strains, with zones of inhibition 21 mm between Lb1 and *Staphylococcus aureus*, 20 mm between Lb1 and *Enterococcus faecalis*, 18 mm between Lc2 and *Staphylococcus epidermidis*. The isolates Lb1, Lb2 and Lc2, considered as strains having inhibited (by bactericidal effect) the growth of Gram-positive target strains. The Raw Active Supernatants (BAS) of the cultures of the lactic strains, after neutralization, showed resistance to heating and to different storage conditions. The best method for exploring microbial antagonism seems to be that of agar wells, followed by the diffusion method using soaked disks, then by the agar spot test. The antibiogram profiles showed the resistance of 52.7% of Lactobacilli and 44.4% of Lactococci.

Keywords

Antagonism, Antibiogram, Cryopreservation, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, Revivification.

الملخص

تهدف الدراسة إلى تقييم تأثير ظروف الحفظ بالتبريد (سنتين عند -80 درجة مئوية) على الخصائص البكتريوسينية لاثنتي عشرة سلالة لبكتيريا حمض اللاكتيك (6 مكورات اللبنية 6 + عصيات اللبنية) معزولة من الزيتون المائدة الجزائري. بعد إعادة إحيائها وتنقيتها وتوصيفها وتحليل مقاومة المضادات الحيوية . تحديد سلالات المكورات اللبنية والعصيات اللبنية تم بطرق البكتريولوجية الكلاسيكية و توقف على مستوى الأجناس (لأسباب لوجستية). أظهرت اختبارات التضاد الجُزئوميَّة، التي أجريت في المختبر بين بكتيريا حمض اللاكتيك ضد سلالات بكتيرية مستهدفة موجبة وسالبة الجرام، باستخدام ثلاث طرق مختلفة: (طريقة الانتشار في الوسط الصلب باستخدام أقراص مشبعة، اختبار الانتشار في آبار الآجار، اختبار بقعة على الآجار). (أظهر أنه من بين السلالات اللبنية: ثلاث عزلات (اثنتان من العصيات اللبنية وواحدة من المكورات اللبنية) كانت تنتج بكتريوسين، مع تأثير قاتل للبكتيريا المستهدفة موجبة الجرام بشكل أكبر، مع مناطق تثبيط 21 ملم بين 1Lb والمكورات العنقودية الذهبية، 20 ملم بين 1Lb والمكورات المعوية البرازية، 18 ملم بين 2Lc والمكورات العنقودية البشرية. تعتبر العزلات 1Lb و 2Lb و 2Lc بمثابة سلالات تمنع (بتأثير مبيد للجراثيم) نمو السلالات المستهدفة إيجابية الجرام. أظهرت المواد الطافية الخام النشطة (SBA) لمزارع السلالات اللبنية، بعد تحييدها، مقاومة للتسخين وظروف التخزين المختلفة. أفضل طريقة لاستكشاف التضاد الجُزئومي هي طريقة الانتشار في آبار الآجار، تليها طريقة الانتشار باستخدام الأقراص المنقوعة، ثم اختبار بقعة الآجار. وأظهرت دراسة مقاومة المضادات الحيوية الى مقاومة 52.7% من العصيات اللبنية و 44.4% من المكورات اللبنية.

الكلمات المفتاحية

التضاد، المضادات الحيوية، الحفظ بالتبريد، العصيات اللبنية، المكورات اللبنية، الإحياء.

Liste des abréviations :

°C : Degré Celsius

ADH : Arginine Déhydrolase.

An: Anaérobie.

API 10S : Profil 10 testes biochimiques pour entérobactéries

API 20E : Profil 20 testes biochimiques pour entérobactéries

API: Analytical Profile Index

ARA: Arabinose.

Asc: l-ascorbate

ATB: Antibiotique

BBA : Bordj Bouarreridj

BN : Bouillon nutritif

Bt: Batonnêt.

Cc : Cocci.

CIT: Citrate.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CO₂ : Dioxyde de carbone

Da : Dalton (unité de masse atomique)

E.aerogenes : *Enterobacter aerogenes*.

E. coli : *Escherichia coli*.

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

ECBU: Examen CytoBactériologique des Urines

EFSA FEEDAP: European Food Safety Authority Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed.

EMP : Embden-Meyerhof-Parnas (voie métabolique)

EPA : Eau peptonée alcaline

EPSP-REO : Etablissement Public de Santé de Proximité-Ras El Oued

EPT : Eau peptonée tamponnée

FDA: Food and Drug Administration.

FSNV : Faculté des sciences de la nature et de la vie

FST : Faculté des sciences et technologies

Gat : Galactitol (famille de transporteurs)

GLU: Glucose.

GNAB : Gélose Nutritive Alcaline Biliée

Gram (-): G-: Gram negative.

Gram (+): G+: Gram positive.

GSC : Gélose au Sang Cuit

Gut : Glucitol (famille de transporteurs)

H₂S: Sulfure d'Hydrogène.

HFM : Homofermentaires

HMP : Hexose monophosphate (voie métabolique)

HTM : Hétérofermentaires

I : Intermédiaire

IND : Indole.

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

kDa: kilo Dalton.

L: *Lactobacillus*

LAB: Lactic Acid Bacteria (Bactéries lactiques)

Lac: lactose-N,N'-diacétylchitobiose-β-glucoside

Lb : Lactobacilles

Lc : Lactocoques

LDC: Lysine Décarboxylase.

M17 : Milieu M17 pour les lactocoques.

Man : Mannose-fructose-sorbose (famille de transporteurs)

MH : Mueller-Hinton

MRS : De Man, Rogosa et Sharpe pour les lactobacilles.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

ODC : Orithinine Décarboxylase.

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

ONPG : Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside (test enzymatique)

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

pH: potentiel Hydrogène.

PLP : protéine liant les pénicillines.

PTS : le système de phosphotransférase à dépendance phosphoénolpyruvate.

R : Résistant

rpm : rotation par minute

S : Sensible

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. enterica : *Salmonella enterica*

S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*

S. Paratyphi : *Salmonella paratyphi*.

S. pyogenes : *Streptococcus pyogenes*

SAM : Société Algérienne de Microbiologie.

SBA : Surnageant Brut Actif

SC: Souches Cibles.

SFB : Bouillon Sélénite-Cystine

SFM: Société Française de Microbiologie.

T : Témoin.

TDA : Tryptophane Désaminase.

TR : Type Respiratoire.

TSI : Triple Sugar Iron (milieu pour détecter la fermentation de trois sucres)

UFC : Unité Formant Colonie

V/V : Volume/Volume

ZI : Zone d'inhibition

Liste des figures

Figure1	Aspects des lactobacilles après séries de purification sur gélose MRS	14
Figure2	Aspects des lactocoques après séries de purification sur gélose M17	14
Figure3	Aspects des colonies des souches lactiques sur milieux agar	15
Figure4	Aspect des cultures dans un milieux liquides	15
Figure5	Vue microscopique des souches lactiques	16
Figure6	Vue microscopique des lactocoques après coloration de Gram (Gx.100)	17
Figure7	Vue microscopique des lactobacilles après coloration de Gram (Gx.100)	17
Figure8	Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre <i>Escherichia coli</i>	18
Figure9	Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figure10	Histogramme illustrant les zones d'inhibition (en mm) des Lactobacilles contre les (SC)	19
Figure11	Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lc5 contre <i>Escherichia coli</i>	19
Figure12	Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lc5 contre <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Figure13	Histogramme illustrant les zones d'inhibition (en mm) des lactocoques contre les (SC)	20
Figure14	Antibiogramme de souche Lb1	22
Figure15	Antibiogramme de souche Lb2	23
Figure16	Antibiogramme de souche Lc2	23
Figure 17	Histogramme illustrant Effet de température	24
Figure 18	Effet de température 25°C sur l'activité SBA après 30 min	25
Figure 19	Effet de température 60°C sur l'activité SBA après 30 min	25
Figure 20	Effet de température 80°C sur l'activité SBA après 30 min	25
Figure 21	Effet de température 120°C sur l'activité SBA après 30 min	25
Figure 22	Histogramme illustrant Effet de temps de conservation	26
Figure 23	Effet de stockage à 37°C pendant 60 jours	26
Figure 24	Effet de stockage à 4°C pendant 60 jours	26
Figure 25	Effet de stockage à -20°C pendant 60 jours	26
Figure 26	Histogramme illustrant la comparaison des méthodes d'antagonisme	27
Figure 27	Méthode d'antagonisme des puits sur Gélose	27
Figure 28	Méthode d'antagonisme des disques imprégnés sur Gélose	27
Figure 29	Méthode d'antagonisme des points (spots) sur Gélose	27

Liste des Tableaux :

Tableau I :	Enrichissement sélectif des souches cibles (SC) et les milieux utilisés.	5
Tableau II :	Procédure d'ensemencement et caractérisation des souches/isolats cibles (SC) sur milieux sélectifs Gélosés.	6
Tableau III :	Les observations microscopiques et les résultats des tests de catalase/oxydase effectués sur les souches sélectionnées.	17
Tableau IV :	Résultats d'antagonismes des lactobacilles testées contre les souches cibles en mesurant les zones d'inhibition en mm.	18
Tableau V :	Résultats d'antagonisme des souches de Lactocoques testées contre les souches cibles, mesurant les zones d'inhibition en mm.	20
Tableau VI :	Caractéristiques des souches lactiques sélectionnées.	21
Tableau VII :	Antibiogramme des souches lactiques sélectionnées et de références.	22
Tableau VIII :	Antibiogramme des souches cibles à Gram négative.	23
Tableau IX :	Antibiogramme des souches cibles à Gram positive.	23
Tableau X :	Effets de la température sur l'activité antagoniste des LAB.	24
Tableau XI :	Effets de temps de stockage (Conservation) sur l'activité antagoniste des LAB.	26
Tableau XII :	Comparaison et évaluation des différentes méthodes d'antagonisme.	27

Introduction

La fermentation des matières premières issues d'agriculture végétale, est un procédé ancestral, utilisé pour produire des denrées alimentaires fermentées de haute qualité nutritionnelle. Ces processus, reposant sur l'inoculation des matières premières, l'inoculation intentionnelle de cultures microbiennes, vise à obtenir des aliments stables, bénéfiques pour la santé, grâce à l'acidification, la production de composés aromatiques et des bactériocines (Bourdichon *et al.*, 2012; Wolfe et Dutton, 2015; Tamang, Watanabe et Holzappel, 2016; Marco *et al.*, 2017; Rezac *et al.*, 2018). Bien que les cultures microbiennes soient utilisées dans divers secteurs, tels que les produits laitiers, carnés, pains et boissons alcoolisées, de nombreux processus de fermentation, notamment des céréales, des légumes, des fruits et des poissons, demeurent encore spontanés (Hutkins, 2019). La recherche s'oriente vers l'intégration de cultures microbiennes spécifiques dans ces processus, afin d'améliorer la vitesse, la qualité de la fermentation, de garantir des produits finaux de consistance uniforme, de qualité meilleure. Dans les pays en développement, la fermentation des végétaux (choux, manioc, concombres, olives, betteraves rouges, oignons, tomates, Olives vertes, etc...) effectuée par des méthodes artisanales (Cook *et al.*, 1987). Les olives de table, sont considérées comme des fruits les plus importants au monde, avec une production mondiale annuelle dépassant les 2,7 millions de tonnes (I.O.O.C, 2018). La fermentation des olives vise à préserver les fruits, tout en améliorant leurs attributs organoleptiques. Les différentes méthodes de fermentation d'olives, telles que les styles Espagnol, Grec et Californien, reposent sur l'activité des bactéries lactiques (LAB), qui acidifient la saumure par la production d'acides organiques dont le lactate, assurant ainsi le contrôle microbiologique, prolongeant la durée de conservation des olives (Papadelli *et al.*, 2015; Sorrentino *et al.*, 2016). La fermentation des olives est une compétition entre LAB et flores eucaryotes, les levures ont un rôle minime, contribuant à l'arôme des olives. Vu l'importance du rôle des LAB dans la fermentation des olives, beaucoup des travaux, focalisant le processus technologique lui-même, sont directement associées aux rôles des LAB (Hurtado *et al.*, 2012). En outre, les bactéries lactiques produisent des bactériocines, inhibant la croissance des bactéries d'altération, renforçant ainsi la conservation des aliments (Cotter *et al.*, 2005). Les tests *in vitro*, d'antagoniste des LAB, sont utilisés pour sélectionner les souches bacteriocinogenes, offrant une corrélation significative avec leur efficacité dans ce processus (Saarisalo *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2020). Tous les produits alimentaires sont soumis à la fermentation lactique, qui permet également de transformer les produits

végétaux, assurant ainsi une sécurité alimentaire optimale grâce à l'acidification et à la production de bactériocine, ainsi que la qualité finale des aliments grâce à la production de composés aromatiques. En outre, il est maintenant possible de leur attribuer un rôle indéniable, favorable à la santé humaine. Cependant, des cas extrêmement rares d'infections ont été relevés. Ils surviennent toujours dans un contexte clinique de lésion préalable ou de maladie sous-jacente débilante (Desmazeaud., 1996).

La capacité des souches lactiques à inhiber la croissance de micro-organismes indésirables, tels que les champignons, levures et certains groupes de bactéries, est cruciale dans le choix des inoculants. Pour évaluer cette activité antimicrobienne, le test d'antagonisme, *in vitro*, tel que décrit par Harris *et al.*, (1989) et modifié par Amaral *et al.*, (2020), est utilisé lors de la sélection des souches bacteriocinogènes. Cette méthode implique la culture simultanée des espèces microbiennes d'altération (souches cibles) et des LAB. L'évaluation de la capacité des LAB à inhiber la croissance des micro-organismes indésirables, est obtenue en mesurant les diamètres des zones (halos) d'inhibition formées (Amaral *et al.*, 2020). En outre, l'activité antagoniste des LAB, résulte de divers mécanismes tels que la production d'acides organiques: acide lactique, d'acide acétique, de peroxyde d'hydrogène, de lactate peroxydase, de lysozyme, de 1, 2 propanediol, ainsi que de bactériocines (Nes *et al.*, 2012). Ces bactériocines, dirigé contre les Bactéries impliquées dans la détérioration des aliments, et les espèces pathogènes d'origine alimentaire, y compris *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Listeria* (Cotter *et al.*, 2005).

Les tests d'activité antagoniste, doivent être intégré en tant que critère de sélection supplémentaire des souches lactiques d'intérêt probiotique. Des travaux de recherche: Saarisalo *et al.*, (2007); Amaral *et al.*, (2020): ont utilisé les résultats relatifs aux activités antagonistes, comme critère pour sélection des souches de fermentation des végétaux, démontrant une corrélation significative entre tests *in vitro* et application sur substrat de fermentation. La sélection de nouveaux isolats lactiques probiotiques, à partir des variétés d'olives de tables est un enjeu scientifique/industriel important. L'évolution des connaissances, en ce domaine, a conduit à la sélection de nouvelles souches, aux propriétés spécifiques et aux potentialités probiotiques prometteuses (Ruiz-Barba *et al.*, 1991; 1994).

Dans ce contexte précis, se situent l'objectif de la présente étude, qui se veut une contribution à l'évaluation, *in vitro*, des potentialités bacteriocinogènes des souches

lactiques cryoconservées, isolées des olives de tables, dirigé contre des souches pathogènes à Gram positif et négatif. Cela par réalisation des étapes suivantes:

1. Récupération, revivification (réactivation) et purification des souches lactiques et des souches cibles ;
2. Isolement, caractérisation et sélection des souches lactiques d'intérêt probiotique ;
3. Exploration de leurs antagonismes *in vitro* contre des isolats cibles procaryotes à paroi Gram+ et Gram-, avec comparaison des différentes méthodes d'interactions antimicrobiennes ;
4. Identification biochimique et établissement de leurs profils antibiogrammes ;
5. Étude de l'impact de la température et du temps de stockage (conservation) sur l'activité antibactérienne.

Le présent mémoire est organisé en parties suivantes: Matériel et Méthodes, Résultats, Discussion, Conclusion et enfin références bibliographiques.

Partie expérimentale

2. Matériels et méthodes:

Lieu de réalisation de l'étude:

Cette étude a été réalisée conjointement au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire de microbiologie FST, Université de BBA, Algérie.
- Laboratoire de microbiologie appliquée FSNV, Université de BBA, Algérie.
- Laboratoire de microbiologie et parasitologie, EPSP-REO, BBA, Algérie.

Elle s'est déroulée durant la période de février 2024 au juin 2024.

2.1. Matériels:

2.1.1 Matériel et milieux de cultures

Le matériel, l'appareillage, les réactifs et les produits chimiques utilisés dans notre étude sont illustrés dans l'Annexe I. Les milieux de culture ainsi que leur composition sont décrits dans l'Annexe II.

2.1.2 Matériel biologique

a. Les souches lactiques (Lactobacilles et Lactocoques) de référence ont été isolées à partir de médicaments (probiotiques). Les lots et les notices correspondantes sont listés dans l'Annexe I.

b. Les souches pathogènes, fournies par le laboratoire d'analyse médicale, service de microbiologie et parasitologie EPSP, REO, province BBA, Algérie, sont mentionnées dans l'Annexe I.

c. Les souches lactiques: Concernant les souches lactiques, Un lot de souches lactiques est conservé (congelé) par cryoprotection à -80°C depuis juin 2022 dans deux milieux liquides : – le bouillon M17 pour les souches lactocoques et le bouillon MRS pour les lactobacilles, additionné de 30 % de glycérol bidistillée fourni par le Docteur A. Meribai.

2.2 Méthodes:

2.2.1 Récupération des souches lactiques et des souches cibles

Les souches bactériennes conservées sont soumises à une agitation douce dans un bain-marie réglé à 30°C, ou simplement laissées à décongeler naturellement dans ce même bain-Marie. Pour garantir une décongélation uniforme (sans endommagement) des cellules bactériennes, celle-ci est effectuée partiellement dans le bain-marie, puis se poursuit à

température ambiante sur la paillasse avant leur utilisation. Ce processus de décongélation est rapide, prenant environ quelques minutes.

2.2.2 Revivification des souches lactiques :

a. Revivification des lactobacilles :

Les lactobacilles ont été réactivées en utilisant un nouveau milieu liquide MRS (De Man et *al.*, 1960). Pour cela, nous avons inoculé 5 ml d'une souche lactique dans un tube contenant également 5 ml de bouillon MRS (V/V). Après une agitation douce et suffisante pour assurer leur homogénéisation, nous avons procédé à une incubation à 37°C pendant une période de 24 à 48 h, jusqu'à l'obtention d'un coagulum (Annexe IV).

b. Revivification des lactocoques :

La réactivation des lactocoques a été effectuée dans un nouveau milieu liquide M17 (Terzaghi et Sandine, 1975). Pour cela, 5 ml d'une souche lactique a été inoculée dans un tube contenant également 5 ml de bouillon M17 (V/V).

Après une agitation appropriée pour les mélanger, l'incubation a été réalisée à 37°C pendant une période allant de 24 à 48 h, jusqu'à l'obtention d'un coagulum (Annexe IV).

2.2.3 Isolement et identification des souches cibles (SC)

2.2.3.1 Enrichissement

Les souches cibles (SC), notamment les pathogènes, ont été enrichies dans différents milieux liquides, selon le type de bactérie: le bouillon Sélénite-Cystine (SFB) pour *Salmonella enterica*, l'eau peptonée pour les entérobactéries, et le milieu Rothe pour *Enterococcus faecalis*. Les autres bactéries, ne nécessitant pas d'enrichissement, ont été directementensemencées dans du bouillon nutritif (BN) (Tableau I).

Tableau I : Enrichissement sélectif des souches cibles (SC) et les milieux utilisés

Souches cibles	Milieu d'enrichissement
<i>Escherichia coli</i>	Eau peptonée
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Eau peptonée
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Eau peptonée
<i>Salmonella enterica</i>	Bouillon SFB Cystine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Eau peptonée
<i>Vibrio spp</i>	Eau Peptonée Alcaline (EPA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Eau peptonée
<i>Enterococcus faecalis</i>	Milieu Rothe
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Eau peptonée
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Eau peptonée

2.2.3.2 Isolement

Les souches bactériennes sont isolées à partir d'un milieu d'enrichissement, en utilisant une anse à platine pour ensemercer une goûte du milieu par stries sur des milieux sélectifs en gélose (voir Tableau II). Après 24 h d'incubation à 37°C, chaque souche présente des colonies caractéristiques (aspect, taille, couleur et contour) et passée ensuite par la purification sur divers milieux de culture (Annexe VI).

Tableau II : Procédure d'ensemencement et caractérisation des souches/ isolats cibles (SC) sur milieux sélectifs gélosés.

Souches Bactériennes	(Gram)	Origine	Milieux sélectif (d'isolement)
<i>E. coli</i>	G-	Liquide d'ascite	Chromagar d'orientation
<i>K. pneumoniae</i>	G-	Urine (ECBU)	Chromagar d'orientation
<i>E. aerogenes</i>	G-	Urine (ECBU)	Chromagar d'orientation
<i>S. enterica</i>	G-	Eaux potable (Control)	Hektoen Agar
<i>Vibrio spp</i>	G-	Eaux potable (Control)	GNAB
<i>P. aeruginosa</i>	G-	Eaux potable (Control)	Chromagar d'orientation
<i>S. aureus</i>	G+	Plaie (infection)	Chapman Stone
<i>E. faecalis</i>	G+	Voies urinaires (ECBU)	Chromagar d'orientation
<i>S. epidermidis</i>	G+	Plaie infectée	Chapman Stone
<i>S. pyogenes</i>	G+	Liquide d'articulation	Gélose au sang cuit (GSC)

2.2.3.3 Identification des caractères biochimiques des souches cibles

A partir des colonies caractéristiques présentées sur les milieux sélectifs, la détermination des caractères biochimiques spécifiques est réalisée pour confirmer l'appartenance des souches avant leur utilisation (Annexe V).

Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement des galeries Api et galeries classiques

La préparation des suspensions bactériennes se fait en utilisant 5 ml d'eau physiologique (EP) à partir d'une colonie suspecte soigneusement individualisée à l'aide d'une anse à platine stérile. Cette suspension est ensuite incubée à 37°C pendant 24 h. L'identification des souches bactériennes se fait en ensemençant les galeries biochimiques Api 10S pour les entérobactéries et Api 20E pour *Pseudomonas aeruginosa*. Pour *Staphylococcus aureus*, l'identification se fait par la recherche de la coagulase libre. Une galerie classique contenant des tests tels que ONPG, TSI, Mannitol mobilité, Catalase, Oxydase et Citrate de Simmons est utilisée (Annexe V). L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (Biomerieux).

2.2.4 Purification des souches lactiques

Les souches lactiques revivifiées sont purifiées en les ensemençant par stries sur gélose MRS et M17, puis incubées à 37°C pendant 24 à 48 h. Cette étape est répétée jusqu'à l'obtention d'une souche pure, de morphologie bactérienne uniforme, permettant d'observer leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques, telles que leur taille, leur forme et leur couleur.

2.2.5 Caractères biochimiques, morphologiques et culturels des LAB

L'identification préliminaire des isolats lactiques au niveau du genre est réalisée en suivant les critères de Gonzalez et *al.*, (2000) en utilisant des méthodes incluant la caractérisation morphologique et physiologique. Les isolats sont examinés pour la coloration de Gram, la production de catalase et l'activité oxydase. De plus, ils ont été testés pour leur croissance à 10°C pendant 10 jours, à 45°C pendant 48 heures, et pour la production de CO₂ à partir du glucose (Collins et Hall. 1984). Les espèces LAB isolées sont testées pour l'utilisation des sucres (Corsetti et *al.*, 2001). L'étude macroscopique permet de décrire l'aspect, la forme, le contour, la surface et la couleur des colonies.

2.2.5.1 Caractères biochimiques

a. Test catalase

L'enzyme catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée (H₂O₂). Une goutte de H₂O₂ est déposée sur une lame contenant une colonie prélevée à partir de la gélose MRS/ M17. La décomposition de H₂O₂ est traduite par un dégagement gazeux sous forme de mousse et de bulles (Delarras, 2007; Guiraud, 2003; Marchal et *al.*, 1991).

b. Production de gaz

Ce test classe les bactéries en fonction de leur type fermentaire : homofermentaires (HFM) et hétérofermentaires (HTM). Des tubes de 10 ml de bouillon MRS/ M17 contenant une cloche de Durham sont inoculés avec une colonie distincte, puis incubés à 37°C pendant 48 h. À l'issue de cette observation, seules les souches de forme bacillaire et cocci, Gram positif et catalase négative sont sélectionnées pour la suite de l'étude (Garvie, 1984).

c. Fermentation des Sucres

Ce test est réalisé en cultivant les souches lactiques dans divers milieux tels que mannitol mobilité, citrate de Simmons, une galerie Api (les sucres), et des glucides ciblés comprenant le mannose, le L-Arabinose, le fructose, le maltose et le sorbitol (Bentoura et *al.*, 2017; Holt et *al.*, 1994).

d. Test du milieu TSI

Utilisé pour détecter la fermentation de trois sucres (lactose, glucose et saccharose). Ensemencez le culot par une piqûre profonde et la pente par une strie médiane, puis incubez pendant 24 h à 37°C (Leveau et Bouix, 1980).

e. Recherche de l'Oxydase

Sur une lame, on dépose un disque d'oxydase et une goutte d'eau distillée, un peu de culture lactique est prélevée et déposée sur le disque. Un résultat positif se manifeste par une coloration rose violette (Delarras, 2007; Marchal et *al.*, 1991). L'activité oxydase a été identifiée en utilisant des bandelettes indicatrices de couleur pour l'oxydase. (De Man et *al.*, 1960, Harrigan et McCance, 1976).

2.2.5.2 Caractères physiologiques

a. Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer les LAB thermophiles des LAB mésophiles (Man et *al.*, 1960; Le veau et *al.*, 1991). Les cultures sont incubées à différentes températures : 30, 37 et 44°C pendant 48 h sur bouillon MRS/ M17. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (Hassaine, 2013).

b. Production de CO₂ de la Fermentation du Glucose

Pour déterminer la production de CO₂ de la fermentation de glucose par les souches de *Lactobacillus/ lactococcus*, nous avons ensemencé des colonies d'une culture pure dans le bouillon MRS/ M17 contenant une cloche de Durham et incubé à 30°C pendant 24 à 48 h en aérobiose et anaérobiose. La présence de gaz dans la cloche indique qu'il y a production de CO₂ (Garvie, 1984).

2.2.6 Conservation des souches

Les modes de conservations suivants ont été utilisés :

2.2.6.1 Conservation à court terme

Les bactéries à Gram-positifs et négatifs pour la catalase sont transférées dans des tubes de bouillon MRS/M17 inclinés et conservées à +4°C après une incubation de 48 h à 37°C, selon leur température de croissance optimale (Jose et *al.*, 2015).

2.2.6.2 Conservation à long terme

Les isolats sont stockés à -20°C dans du bouillon MRS/ M17 avec 28% de glycérine (El-Soda et *al.*, 2003). Les cultures pures stockées sont ressuscitées par deux sub-cultures dans du bouillon MRS/M17 avant chaque utilisation.

2.2.7 Exploration des effets inhibiteurs dirigés contre des souches cibles (SC)

a. Préparation des pré-cultures

Les souches lactiques ont été pré-cultivées dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon M17 et MRS, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Ensuite, les souches lactiques ont été transférées dans les bouillons MRS et M17, tandis que les souches pathogènes cibles, telles qu'*E. coli* et *Salmonella enterica*, ont été repiquées dans de l'eau peptonée, et *Vibrio.sp* dans de l'eau peptonée alcaline à 37 °C pendant 24 h (Allouche et *al.*, 2010; Bentoura et *al.*, 2017).

b. Méthode de diffusion en milieu solide sur disque (disques imbibés)

Pour déterminer l'activité antibactérienne des solutions de cultures filtrées(SBA), préparés à partir des souches lactiques, la méthode de diffusion en milieu solide sur disque a été utilisée. Des tapis des souches cibles à Gram-négatives: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Vibrio.sp*. Ainsi que des souches cibles à Gram-positives: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* et *Streptococcus pyogenes*, ont étéensemencées sur la gélose Muller-Hinton (MH). Un papier filtre Whatman grade 3 a été imprégné de la solution de SBA correspondante obtenu par centrifugation des cultures de

LAB (6000rpm pendant 10 min) et placé au centre de la boîte inoculée. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 ± 1 °C pendant 24 h et le diamètre de la zone d'inhibition (ZI) a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse numérique en trois répétitions (Buncic et al., 1997).

Les isolats LAB qui inhibaient la croissance d'une souche cible étaient considérés comme inhibiteurs pour cette espèce (Maragkoudakis et al., 2006). La libération d'un inhibiteur diffusible au début de la croissance de la culture test est responsable de l'antagonisme (Tagg et al., 1976). La diffusion de substances responsables des interactions bactériennes a été améliorée par incubation à 37 °C pendant 24h (Tadesse et al., 2005).

c. Estimation du potentiel inhibiteur des bactéries lactiques

La présence d'une zone d'inhibition autour des disques est un signe d'activité antibactérienne. Un résultat positif de l'antagonisme se traduit par la présence des halos clairs autour des souches de lactobacilles et lactocoques (un résultat est considéré comme positif si le diamètre est supérieur à 2 mm) (Abeet et al., 1995; Guessass, 2007). Les zones d'inhibition (ZI) ont été mesurées diamétralement en utilisant l'équation suivante :

$ZI(\text{mm}) = \text{Diamètre de la zone inhibitrice (mm)} - \text{Diamètre du disque (06mm)}$ (Bentoura et al., 2017).

Les résultats sont exprimés comme suit : >16 mm (++++), diamètre >10 mm (+++), diamètre entre 6 et 10 mm (++) , diamètre entre 3 et 6 mm (++) , diamètre entre 1 et 3 mm (+), pas d'inhibition (-) (Siroli et al., 2017).

2.2.8 Réalisation des antibiogrammes

2.2.8.1 Les souches cibles

Les sensibilités antibactériennes de toutes les souches bactériennes (G- : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes.*, *Pseudomonas aeruginosa.* et G+ : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*) ont été déterminées en utilisant la méthode standard de diffusion sur disque de Kirby-Bauer A.(1966) pour 11 antibiotiques, selon CLSI (2014). Les antibiotiques utilisés ont été adaptés selon les recommandations. Lorsqu'un isolat était résistant à au moins quatre classes différentes d'antibiotiques, il était considéré comme multirésistant. Le comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques a été testé sur gélose Mueller-Hinton (MH) en utilisant des disques commerciaux imprégnés d'antibiotiques. Pour la préparation de l'inoculum bactérien, des

colonies bien isolées ont été prélevées après une nuit de culture et déposées dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique (EP), puis homogénéisées à l'aide d'un vortex. Cette préparation a été étalée sur milieu MH à l'aide d'une pipette Pasteur, puis des disques d'antibiotiques ont été déposés stérilement par boîte de MH. Après 24h d'incubation à 37 °C, des halos clairs apparaissent autour des antibiotiques inhibiteurs de croissance. Les résultats ont été exprimés en : sensible (S), intermédiaire (I), ou résistant (R) grâce à la méthode standard de diffusion sur disque. La liste des antibiotiques testés contre les souches lactiques et les souches cibles (SC) est présentée dans l'annexe III.

La lecture s'effectue par la mesure de la zone d'inhibition (ZI) (CLSI 2014).

2.2.8.2 Les souches lactiques

Pour déterminer la sensibilité/résistance des souches lactiques testées à plusieurs antibiotiques, nous avons sélectionné des souches lactiques ayant donné des effets inhibiteur (antagoniste) positifs contre des souches cibles (SC). Les lactobacilles Lb1, Lb2, Lb4 et Lb7, ainsi que les lactocoques Lc1, Lc2, Lc3 et Lc5: Ces souches ont été sélectionnées pour les antibiogrammes. Les souches de référence ont été utilisées (comme témoin) pour les comparaisons.

Les antibiotiques: ampicilline, vancomycine, gentamicine, kanamycine, érythromycine, clindamycine, tétracycline, ciprofloxacine et chloramphénicol) ont été choisis pour le test de sensibilité/résistance aux antibiotiques des LAB selon les recommandations des organismes EFSA FEEDAP Panel et *al.*, (2018). Les souches lactiques sélectionnées ont été testées pour leur résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur disque, selon le protocole préconisé par: Domingos-Lopes et *al.*, (2017). Des disques d'antibiotiques ont été utilisés pour déterminer la résistance des isolats à 9 antibiotiques. Les disques ont été stérilement placés sur la surface d'une boîte de gélose Mueller-Hinton ensemencée avec les isolats de LAB et incubés à 37 °C pendant 24h- 48h. Après l'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque a été mesuré. Chaque isolat a été classé comme sensible, résistant ou intermédiaire selon le diamètre de la zone d'inhibition. Les antibiotiques suivants ont été testés (annexe III) et les profils de sensibilité/résistance ont été analysés selon les normes d'interprétation de l'EFSA FEEDAP Panel et *al.*, (2018).

2.2.9. Effets de la température et du temps de stockage sur l'activité antibactérienne

Pour déterminer la thermostabilité du Surnageant Brute Actif (SBA), des solutions contenant la bactériocine ont été traitées à 60 °C, 80 °C et 100 °C pendant 30 min, ainsi qu'à 121 °C pendant 30 min. Ensuite, l'activité antibactérienne des échantillons a été mesurée. Le pourcentage d'activité antibactérienne résiduelle des SBA a été évalué en utilisant la méthode de diffusion sur puits d'agar (Therdatha et al., 2016; Hu et al., 2014). En résumé, les isolats de LAB ont été cultivés dans un bouillon MRS/ M17 à 37 °C pendant la nuit, et la souche pathogène ciblée a également été pré-cultivée dans les mêmes conditions dans de l'eau peptonée. Des puits stérilement percés dans les boîtes inoculées ont été remplis avec 100 ml du SBA LAB à tester pour l'activité antagoniste qui a été centrifugé (10 min à 6000rpm), Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. L'activité antagoniste des souches de LAB a été évaluée en termes de formation de zones d'inhibition (mm) autour des puits (Vinderola et al., 2008; Therdatha et al., 2016; Hu et al., 2014).

L'effet de la conservation à basse température sur le composé a été étudié en maintenant ses solutions à différentes températures (4 °C, 37 °C et -20 °C) pendant différentes périodes du mois (deux mois). Après ces périodes, l'activité antibactérienne de la bactériocine a été testée contre la souche indicatrice. L'activité antibactérienne résiduelle des SBA a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur puits d'agar (Fonesca., 2001;Ogunbanwo et al., 2003; Rajaram et al., 2010).

Pour effectuer ces tests, les souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2 ont été sélectionnées en fonction de leur effet antagoniste remarquable (très positif), contre les souches cibles, *E. coli* à (G-) et *Staphylococcus aureus* à (G+).

2.2.10. Exploration des méthodes d'antagonisme: Comparaison et évaluation

Trois méthodes distinctes d'antagonisme ont été exploré afin d'identifier la technique la plus fiable, pour réaliser des interactions antibactériennes contre les souches cibles à Gram (+) et à Gram (-). Notre objectif était d'évaluer, *in vitro*, les différences entre ces trois méthodes. Les souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2 ont été sélectionnées en fonction de leur effet antagoniste remarquable (très positif) contre les souches cibles, *E. coli* à G- et *Staphylococcus aureus* à G+.

a. Méthode sur gélose par points

L'activité antagoniste des souches de LAB a également été réalisée en utilisant le test sur gélose par points, comme décrit précédemment par Vinderola et al. (2008). Les cultures de nuit des souches cibles (pathogènes) ont été diluées dans de l'eau peptonée avec 1 ml de chaque culture diluée (environ 10^6 UFC/ml) inoculée sur des boîtes d'agar Muller Hinton (MH). L'excès de culture a été retiré après 5 min de contact, et les boîtes ont été laissées à sécher pendant 30 min. et 0.2ml de SBA de chaque souche de LAB ont été déposés en points sur la surface de l'agar inoculé avec les souches cibles. Les boîtes ont été laissées pendant 5 min pour diffusion/ absorption et ensuite incubées à 37 °C pendant 24h. Une zone d'inhibition claire > 1 mm autour d'un point a été mesurée et notée comme positive (Armas et al., 2017).

b. Méthode de diffusion des disques (disques imbibés)

Cette méthode est décrite précédemment; voir la section 2-2-7 sur l'antagonisme des effets inhibiteurs dirigés contre les souches cibles (SC).

c. Méthode de diffusion en puits sur gélose

Cette méthode est décrite précédemment; voir la section 2-2-9, Effets de la température et du temps de stockage sur l'activité antibactérienne.

3. Résultats

3.1. Purification des souches lactiques et les souches cibles (SC)

3.1.1. La purification des souches cibles

Les résultats de purification et d'ensemencement des souches cibles sont décrits dans l'annexe VI.

3.1.2. La purification des souches lactiques

Des isolats ont été récupérés à partir de 12 échantillons (6 lactocoques et 6 lactobacilles) conservait auparavant par cryoconservation. La purification des souches, après revivification, lactiques isolée par plusieurs repiquages successifs sur milieux MRS et M17 (alternation sur milieux liquide), a permis d'obtenir 10 isolats pures des souches lactiques dont: 5 lactobacilles et 5 lactocoques.

a. La Purification des lactobacilles :

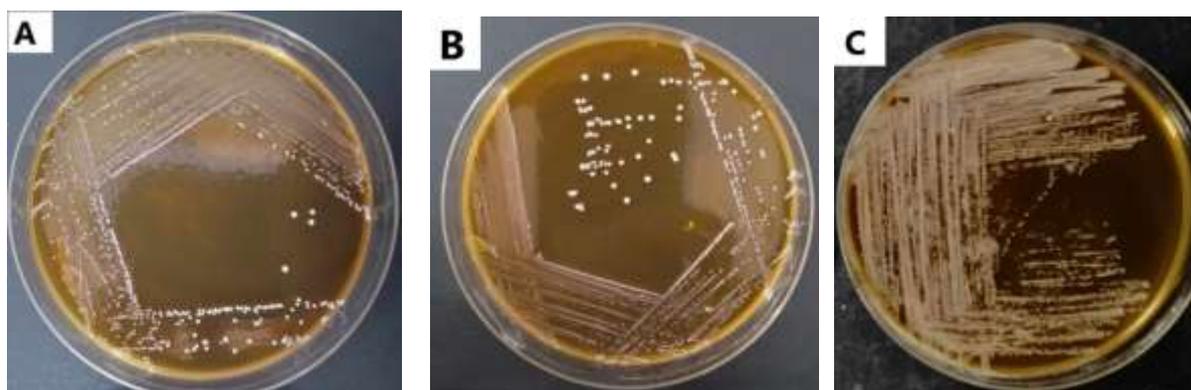


Figure 1: Aspects des lactobacilles après séries de purification sur gélose MRS.

b. La Purification des lactocoques

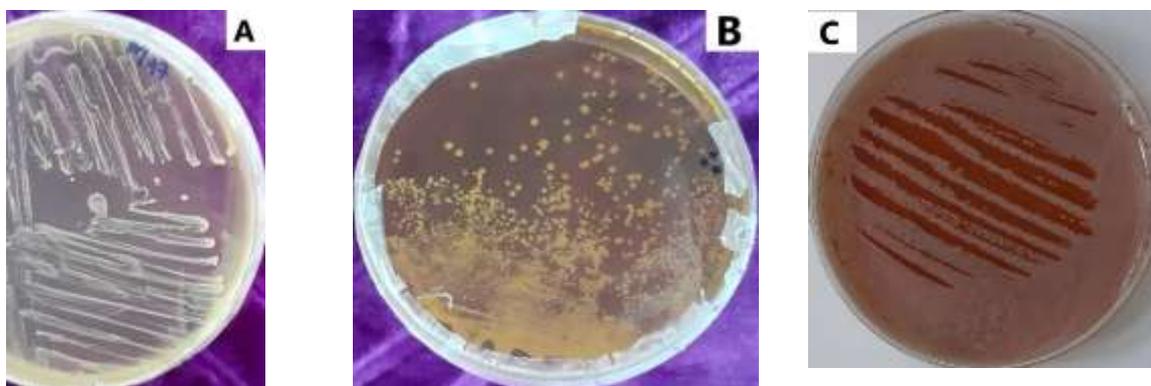


Figure 2 : Aspects des lactocoques après séries de purification sur gélose M17.

3.1.3. Etude des caractères morphologiques et culturaux

3.1.3.1. Aspect macroscopique des lactobacilles

a. Sur milieu solide

Les colonies de lactobacilles sur milieux agar sont généralement petites (2-5 mm) avec des bords entiers, convexes, lisses, brillantes et souvent opaques sans pigment. Dans de rares cas, certaines colonies apparaissent jaunâtres dû à la production des pigments comme les caroténoïdes chez *Lactobacillus plantarum* (Breithaupt et al., 2001). Certaines espèces forment des colonies rugueuses. Des zones de clairance causées par des exo-enzymes ne sont généralement pas observées lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux agar contenant des protéines ou des graisses dispersées. Cependant, la plupart des souches présentent une légère activité protéolytique due à des protéases et des peptidases liées à la paroi cellulaire ou libérées par celle-ci (Kunji et al., 1996).

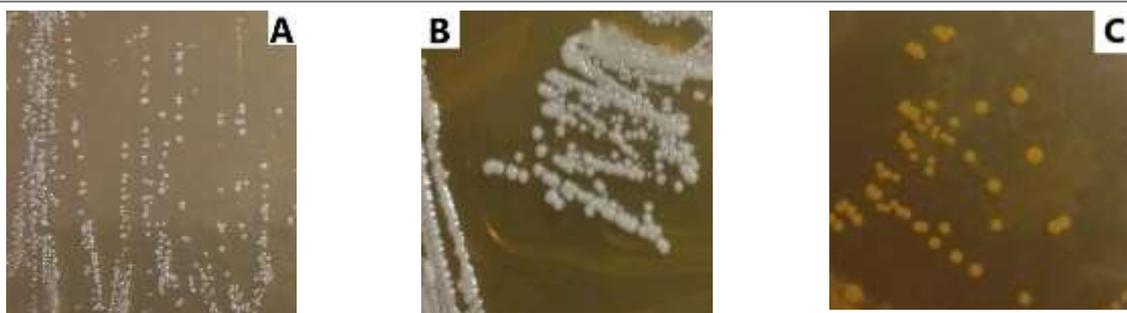


Figure3 : Aspects des colonies des souches lactiques sur milieux agar : **A/** petite colonies, **B/** colonies moyens avec contour irrégulier, **C/** colonies jaunâtre.

b. Sur Milieu liquide

La croissance en milieu liquide se produit généralement dans tout le liquide, mais les cellules se déposent peu après l'arrêt de la croissance. Le sédiment est lisse et homogène, rarement granulaire ou visqueux. L'agrégation des cellules en culture peut être médiée par des facteurs de nature protéique, selon les résultats des travaux de (Schachtsiek et al., 2004).

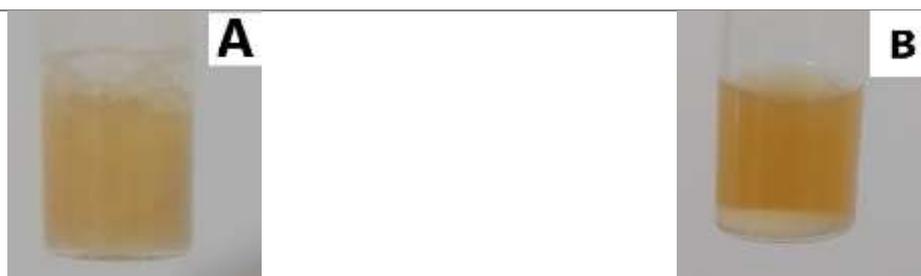


Figure4 : Aspect des cultures dans milieux liquides : **A/** la culture frais ; **B/** La sédimentation des lactobacilles.

3.1.3.2. Aspect microscopique

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram, qui a donné une forme de bacille en bâtonnet et parfois coccobacille d'une couleur violette dont le mode d'association varie d'une souche à une autre. Ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (Joffin et Leryal, 1996).

a. Observation à l'état frais

L'observation microscopique à l'état frais, reflète des isolats qui sont purs, immobiles, parfois ont un arrangement en longues chainettes (figure 7 A).

b. Coloration au bleu de méthylène

A l'état microscopique, après réalisation de frottis bactérien, les lactobacilles ont été apparus sous forme, bacillaire, de couleur bleu, isolées ou en courtes chainettes. Parfois sont arrangées sous forme de V. (figure 5 B,C)

En parallèle, les cellules en forme de coque, répondant aux caractéristiques morphologiques, arrangées en chainettes plus ou moins longue.

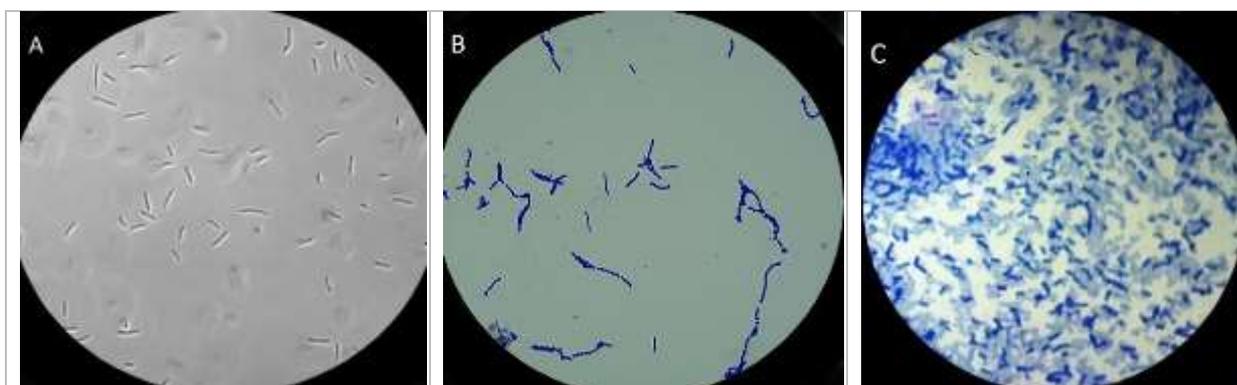


Figure 5: Vue microscopiques : **A)** souche lactique à l'état frais(40x). **B)** lactocoques. **C)** lactobacilles après Coloration au bleu de méthylène (100x).

c. Coloration de Gram

Les isolats ont répondu, positivement à la coloration de Gram (violette). La figure 7 montre des lactobacilles isolés, courtes chainettes. De même, les lactocoques présentées dans la figure 6, ont répondu, Positivement à la coloration de Gram (violette).

Une fois que les isolats ont été colorés à Gram, on peut observer sous microscope des formes de cellules coques et bâtonnes de couleur violette, les autres résultats de coloration de Gram sont illustrées dans l'annexe VII.

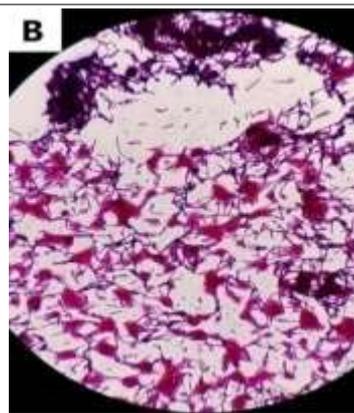
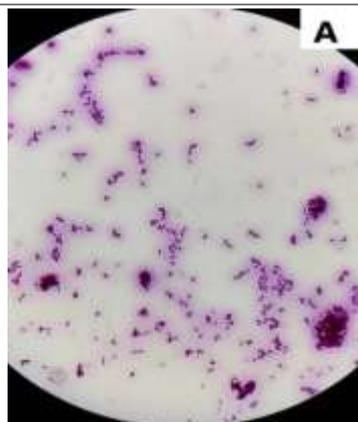


Figure 6:vue microscopiques des lactocoques après Coloration de Gram (Gx.100).

Figure 7:vue microscopiques des lactobacilles après Coloration de Gram: (Gx.100).

3.1.3.3. Test de, Catalase et Oxydase

Le test de catalase détermine la présence de l'enzyme catalase, généralement absente chez les bactéries lactiques, ce qui les différencie d'autres types bactériens. De même, le test d'oxydase détecte la présence de l'enzyme cytochrome oxydase, souvent absente chez les bactéries lactiques, permettant ainsi de les distinguer des autres bactéries (Annexe V).

Tableau III : Les observations microscopiques et les résultats des tests de catalase/oxydase effectués sur les souches sélectionnées.

Souches lactiques	Morphologie	Gram	Catalase	Oxydase
Lb1	Gros bacilles en amas	+	-	-
Lb2	Gros bacilles isolés	+	-	-
Lb4	Gros bacilles en amas	+	-	-
Lb7	Cocco bacilles isolés	+	-	-
Lb8	Bacilles long isolés	+	-	-
Lc1	Coccies en long chainette	+	-	-
Lc2	Diplo coccies	+	-	-
Lc3	Diplo coccies	+	-	-
Lc4	Coccies en long chainette	+	-	-
Lc5	Coccies en courte chainette	+	-	-

3.2. Antagonisme des LAB dirigé contre des souches cibles

Les différentes souches lactiques présentent un spectre d'activité variable vis-à-vis des germes cibles testés. Il a été observé que seules les souches (Lb1, Lb2 et Lc2) sont les plus actives contre les souches cibles. Les zones d'inhibition sont nettes, avec des bordures bien définies, et le diamètre d'inhibition varie entre 4 et 22 mm en fonction de la souche testée (voir tableau IV et V). L'inhibition est considérée comme positive lorsqu'elle dépasse 1 mm, selon Schillinger et Lucke (1989).

3.2.1. Antagonisme des lactobacilles dirigé contre des souches cibles

Les résultats supplémentaires évoqués dans l'annexe VIII.

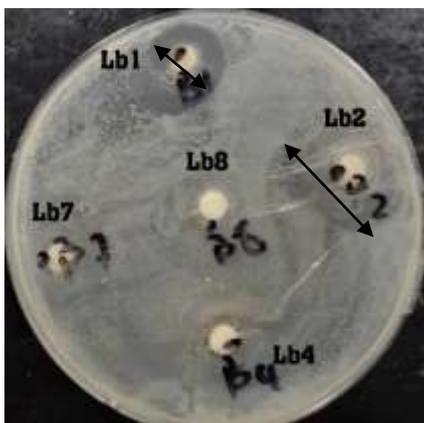


Figure 8: Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre *E. coli*.

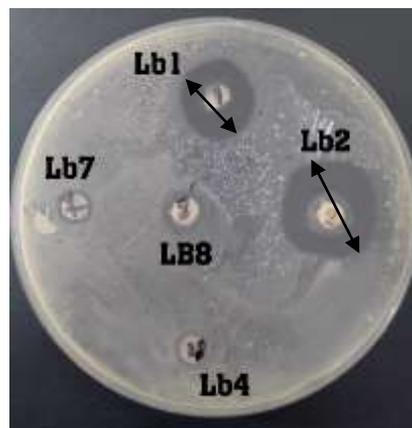


Figure 9: Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre *S. aureus*

Le tableau IV- ce-dissous présente les résultats des interactions entre les souches lactiques (Lactobacilles) et les souches cibles(SC). Longueur de zone d'inhibition (en mm) mesuré après 24 h et 48 h d'incubation.

Tableau IV: Résultats d'antagonismes des lactobacilles testés contre les (SC)

Les souches cibles	Les souches lactiques				
	Lb 1	Lb 2	Lb 4	Lb 7	Lb 8
Gram négative					
<i>E. coli</i>	++	+	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	++	+	+	-
<i>E. aerogenes</i>	+	++	+	++	-
<i>S. enterica</i>	+	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	+	-	-
<i>Vibrio spp</i>	++	+++	++	+	-
Gram positive					
<i>S. aureus</i>	++++	++++	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	++++	++++	+	+	-
<i>S. epidermidis</i>	++++	++++	+	+	-
<i>S. pyogenes</i>	+++	++++	++	-	-

Zone d'inhibition >16 (++++); entre 10 et 16 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (+); diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

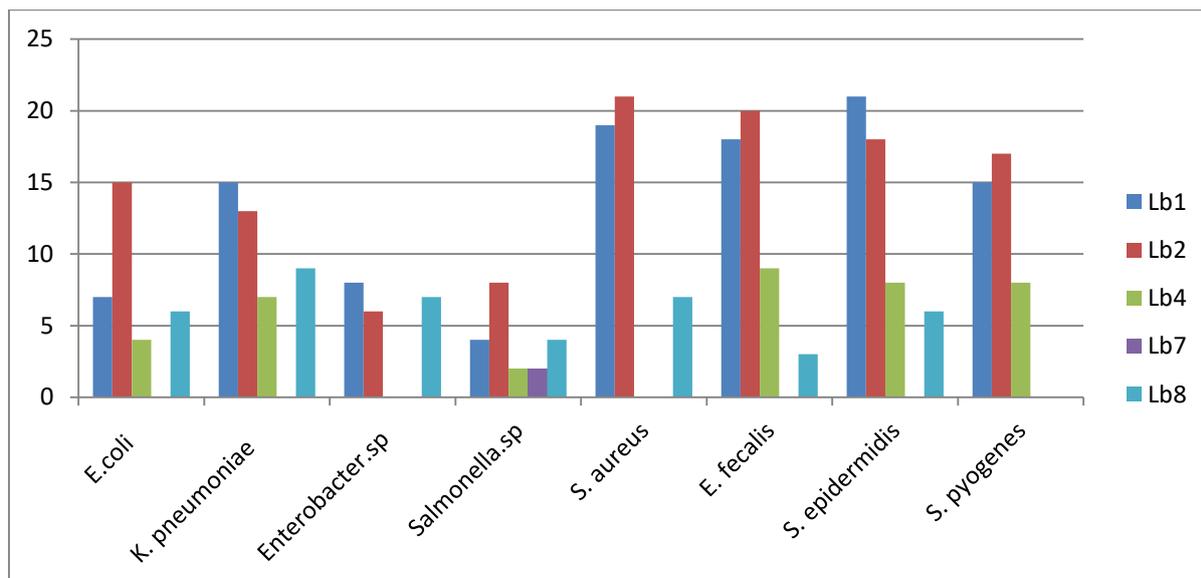
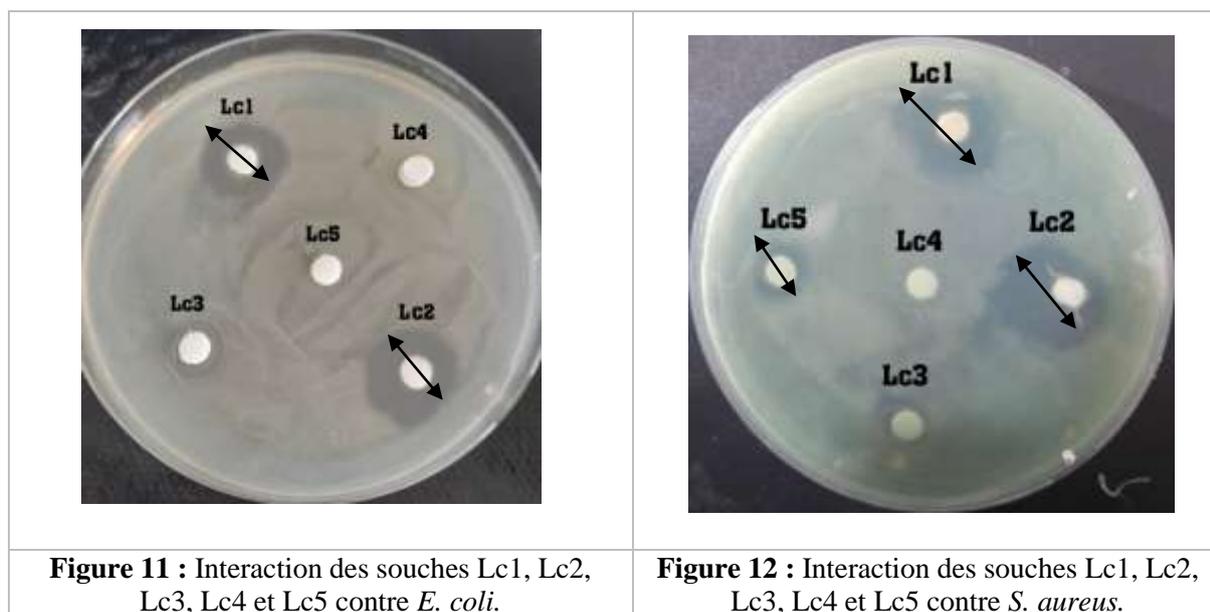


Figure 10 : Histogramme illustrant les zones d'inhibition (en mm) des Lactobacilles contre les souches cibles.

3.2.2. Antagonisme des Lactocoques dirigé contre des souches cibles

Les résultats supplémentaires évoqués dans l'annexe VIII.



Le tableau V- ce-dessous présente les résultats de l'analyse des interactions entre les souches lactiques (lactocoques) et les souches cibles (SC). Longueur de zone d'inhibition en mm mesuré après 24 h et 48 h d'incubation.

Tableau V: Résultats d'antagonisme des souches de Lactocoques testées contre les (SC)

Les souches cibles Gram Négative	Les souches lactiques				
	Lc1	Lc2	Lc3	Lc4	Lc5
<i>E. coli</i>	-	+++	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	+++	+	-	-
<i>E. aerogenes</i>	+	++	+	-	+
<i>S. enterica</i>	-	+	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	++	+	-	-
<i>Vibrio spp</i>	+	+++	+	-	+
Gram positive					
<i>S. aureus</i>	+++	++	-	-	++
<i>E. faecalis</i>	-	+++	++	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	+++	+	-	+
<i>S. pyogenes</i>	-	+++	+	-	-

Zone d'inhibition >16 (++++); entre 10 et 16 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (+); diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

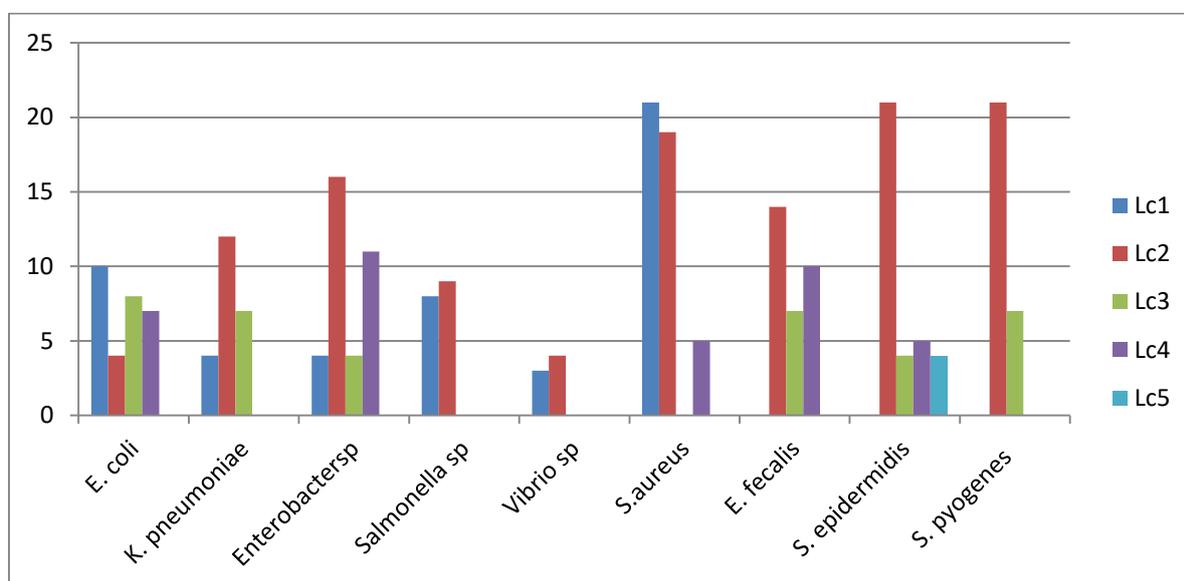


Figure 13 : Histogramme illustrant les zones d'inhibition (en mm) des lactocoques contre les souches cibles.

3.3. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches lactiques sélectionnées :

Trois isolats ont été choisis pour cette partie de l'étude : deux lactobacilles (Lb1 et Lb2) et une lactocoque (Lc2), en raison de leurs propriétés antagonistes remarquables (très positifs).

Tableau VI : Caractéristiques des souches lactiques sélectionnées.

Tests	Les souches Lactiques testées		
	Lb1	Lb2	Lc2
La forme	Bt	Bt	Cc
Mobilité	(-)	(-)	(-)
TR*	An	An	An
Nitrate réductase	(-)	(-)	(-)
Type fermentaire	HTM	HTM	HFM
TSI H ₂ S	(-)	(-)	(-)
Gaz	(-)	(-)	(-)
Mannitol/ mobilité	(+/-)	(+/-)	(+/-)
Citrate de Simmons	(+)	(+)	(+)
Production d'indole	(-)	(-)	(-)
Uréase et du tryptophane désaminase	(-)	(-)	(+)
Lysine décarboxylase: (LDC)	(-)	(-)	(-)
Ornithine décarboxylase: (ODC)	(-)	(-)	(-)
Arginine déshydrogénase:(ADH)	(+)	(+)	(+)
Croissance à différentes temp °C (30, 37,44)	(+)	(+)	(+)

La fermentation des sucres	Glucose			
	Mannose	+	+	+
	Inositol	-	+	-
	Sorbitol	+	+	-
	rhamnose	+	+	-
	Saccharose	+	+	-
	Mélibiose	+	+	-
	L'amygdaline	+	+	+
	arabinose	+	+	-

Bt : bâtonné, Cc : Cocci, An : anaérobie, HMF : homofermentaire, HTF : hétérofermentaire, (+) positif, (-) négatif, TR : type respiratoire.

3.4. Résultats d'antibiogrammes :

3.4.1. Les souches lactiques

Tableau VII : Antibiotogrammes des souches lactiques sélectionnées et des souches de références.

Souches LAB	Antibiotiques								
	TE	CN	VA	K	C	E	CC	P	LEV
Lb1	R	R	R	R	S	R	S	S	S
Lb2	I	R	R	R	S	I	R	S	S
Lb4	S	R	R	R	S	R	S	S	S
Lb7	S	R	R	R	S	S	S	S	R
Lc1	S	R	R	R	S	R	R	S	R
Lc2	S	S	R	R	S	S	S	S	S
Lc3	S	S	R	R	S	R	R	S	S
Lc5	S	R	R	R	S	S	R	S	S
Ref Lb	S	R	R	R	S	S	S	S	S
Ref Lc	S	R	R	R	S	S	S	S	S

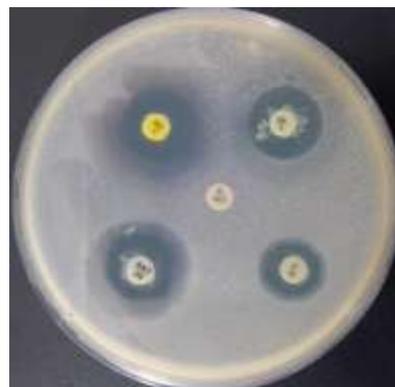


Figure14: Antibiotogramme de souche Lb1

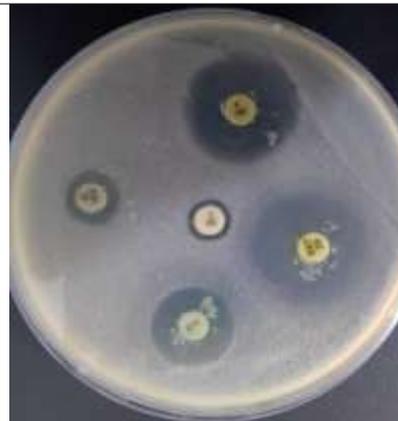
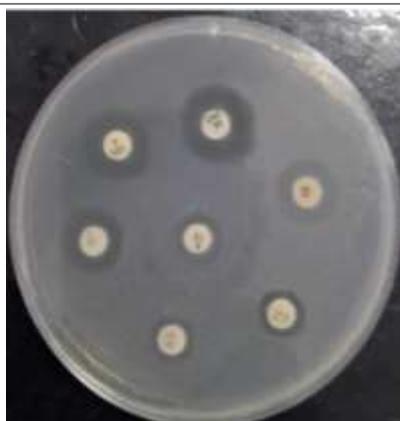


Figure 15 : Antibiotogramme de souche Lb2

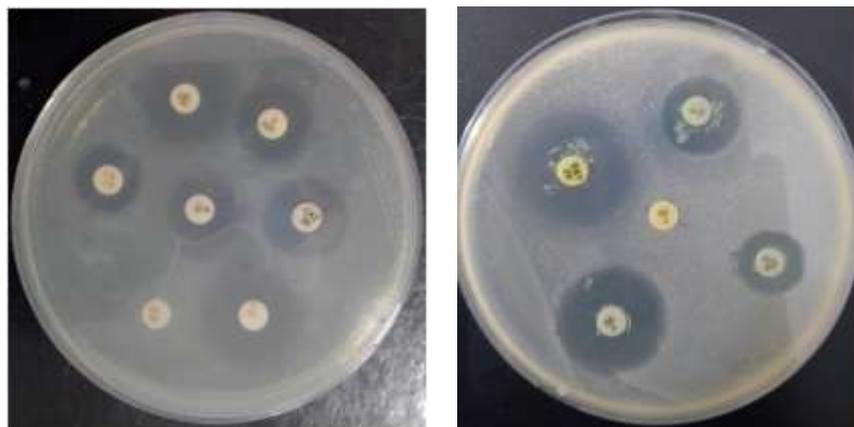


Figure 16: Antibiogramme de souche Lc2

Les résultats supplémentaires évoqués dans l'annexe IX.

3.4.2. Les souches cibles

Tableau VIII : Antibiogrammes des souches cibles à Gram négatives

Souche cible	GN	AK	SXT	C	CAZ	ETP	F	CZ	FF	AMC	CIP
<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S
<i>K. pneumoniae</i>	R	S	R	S	S	S	I	S	S	I	S
<i>E. aerogenes</i>	I	S	I	S	S	I	S	S	S	R	S
Souche cible	GN	CIP	SXT	C	CAZ	ETP	LEV	CT	AZ	TE	TC
<i>P. aeruginosa</i>	I	R	R	S	I	S	S	I	I	S	I

Tableau IX : Antibiogrammes des souches cibles à Gram Positive.

Souche cible	E	OX	VA	R	LEV	OFX	DA	P	GN	CTC	C
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	R	R	S	I	S	R	S
<i>S. pyogenes</i>	I	R	R	S	S	S	R	S	S	I	S
<i>E. faecalis</i>	I	S	R	I	S	S	I	S	I	S	S

TE à la place de LEV pour *s. pyogenes*.

Les résultats des antibiogrammes des souches cibles G- et G+ sont mentionnées dans l'annexe IX.

3.5. Effets de la température et du temps de stockage sur l'activité Antibactérien

La stabilité de la bactériocine chauffée à 60, 80 et 100 °C pendant 30 min, voire à 120 °C pendant 15 min, n'a pas changé de manière significative par rapport à la bactériocine fraîche/témoin. Cependant, l'activité bactériocinique a significativement diminué après chauffage à 121 °C pendant 30 min (Tableau X).

3.5.1. Effets de la température

Tableau X : Effets de la température sur l'activité antagoniste des LAB.

	25°C		60°C		80°C		120°C	
	<i>E-coli</i>	<i>S. aureus</i>						
SBA Lb1	++	++++	++	++	+	++	-	+
SBA Lb2	++	+++	++	+++	+	++	+	+
SBA Lc2	+	++	+	+	++	++	+	+

Zone d'inhibition >16(++++) >10 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (+); diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

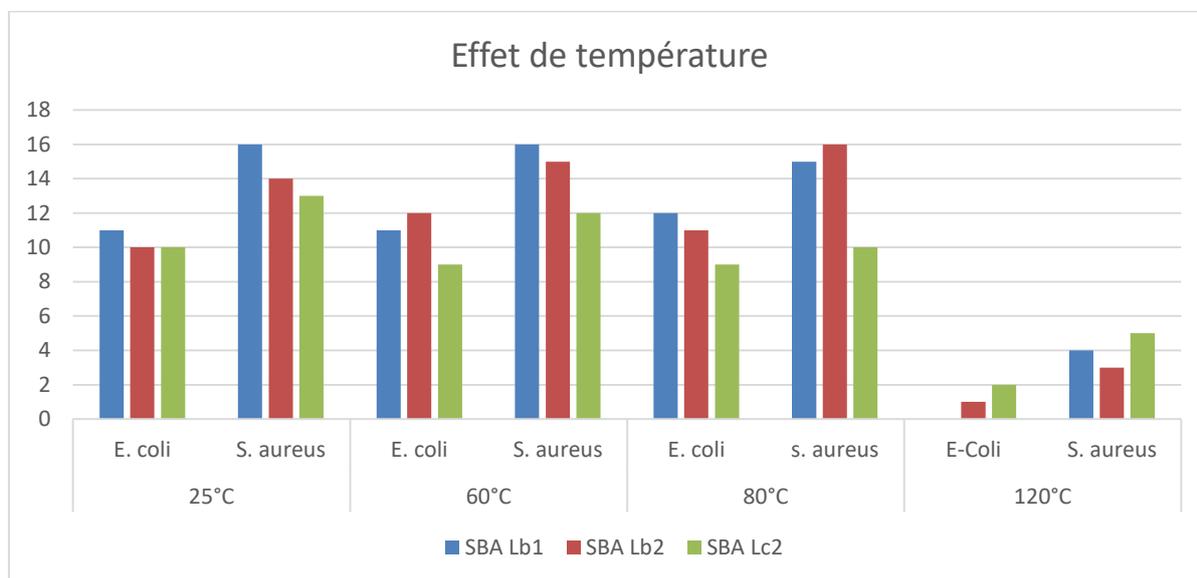


Figure 17: Histogramme illustrant l'effet de température

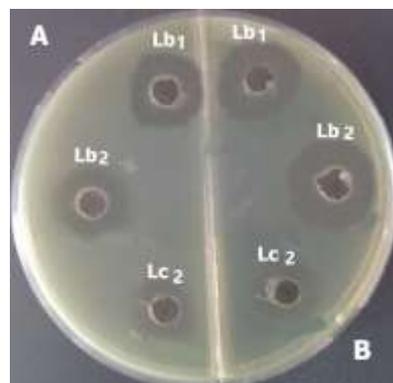


Figure18 : Effet de température 25°C sur l'activité SBA après 30 min.

Figure19 : Effet de température 60°C sur l'activité SBA après 30 min.

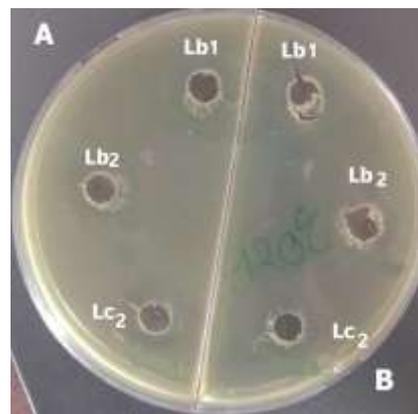
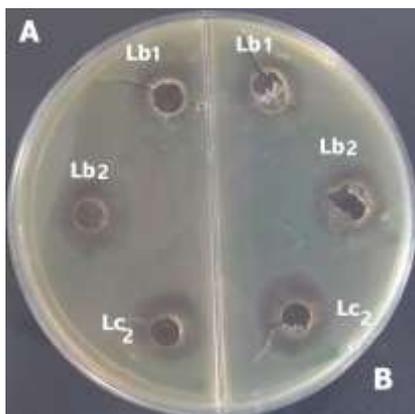


Figure20: Effet de température 80°C sur l'activité SBA après 30 min.

Figure21 : Effet de température 120°C sur l'activité SBA après 30 min.

A : *E-Coli* ; B : *S. aureus*.

3.5.2. Effets de temps de stockage (Conservation) :

Les résultats ont révélé que l'activité de la bactériocine extraite diminuait progressivement pendant le stockage à 37°C jusqu'à 60 jours, et qu'elle était complètement perdue après 60 jours de stockage, avec une différence significative. Le Tableau XI a montré que la bactériocine extraite était stable à 4°C jusqu'à 30 jours, puis son activité diminuait progressivement pendant la période de stockage de 60 à 90 jours, avec une différence significative. En revanche, l'activité de la bactériocine extraite persistait pendant 60 jours à -20°C et il n'y avait pas de différence significative entre les données concernant ces résultats.

Tableau XI : Effets de temps de conservation sur l'activité antagoniste des LAB.

	37°C (2 mois)		4 °C (2 mois)		- 20 °C (2 mois)	
	<i>E-coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E-coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E-coli</i>	<i>S. aureus</i>
SBA Lb1	-	+	++	+++	++	++++
SBA Lb2	-	+	++	+++	++	+++
SBA Lc2	+	+	+	++	++	+++

Zone d'inhibition >16(++++) >10 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (++) ; diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

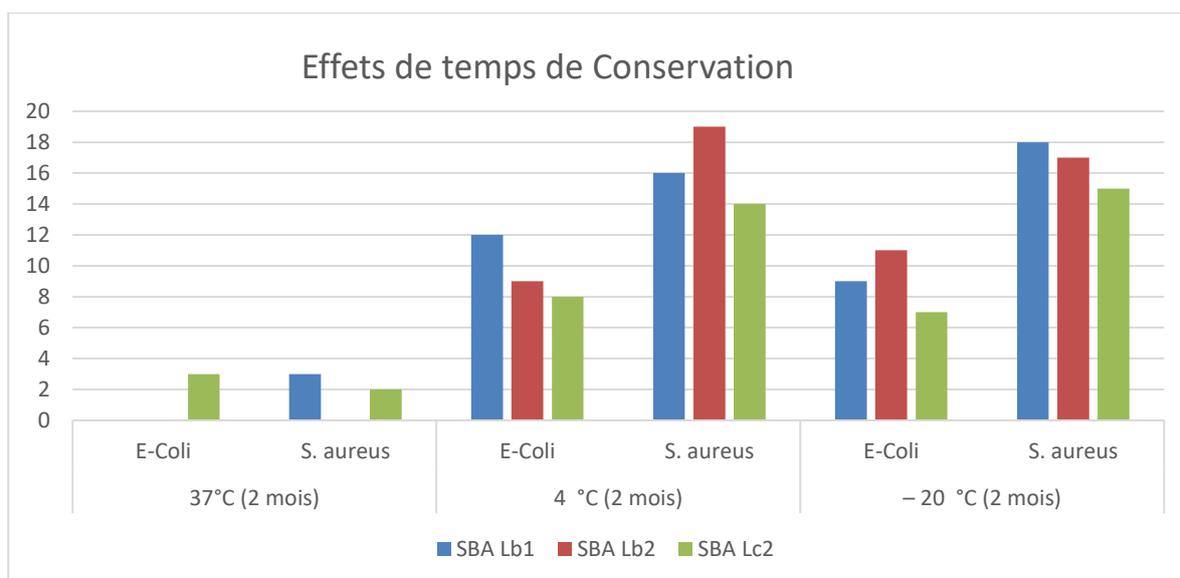


Figure 22: Histogramme illustrant l'effet de temps de stockage (conservation)

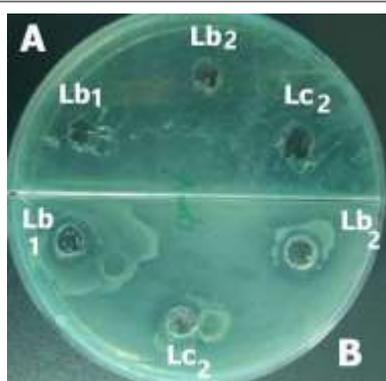


Figure23 Effet de stockage à 37°C pendant 60 jours.

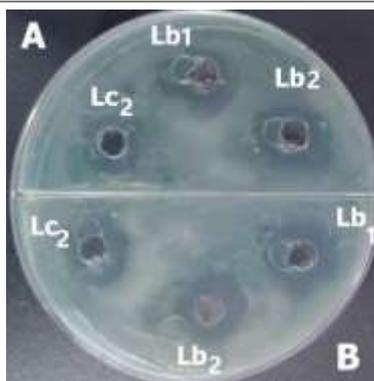


Figure24 Effet de stockage à 4°C pendant 60 jours.
A : *E.Coli.*; B : *S. aureus.*

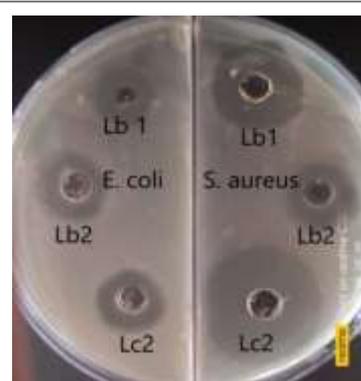


Figure25 Effet de stockage à -20°C pendant 60 jours.

3.6. Exploration des Méthodes d'Antagonisme : Comparaison et Évaluation

Tableau XII : Comparaison et évaluation des différentes méthodes d'antagonisme.

	gélose par puits		disques diffusé		gélose par points	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>s. aureus</i>
Lb1	++	+++	+++	++	+	++
Lb2	++	+++	++	++	+	+
Lc2	++	++	+	++	+	+

Zone d'inhibition >16(++++); >10 mm (+++); diamètre entre 6 et 10 mm (++); diamètre entre 3 et 6 mm (+); diamètre entre 1 et 3 mm (+); pas d'inhibition (-).

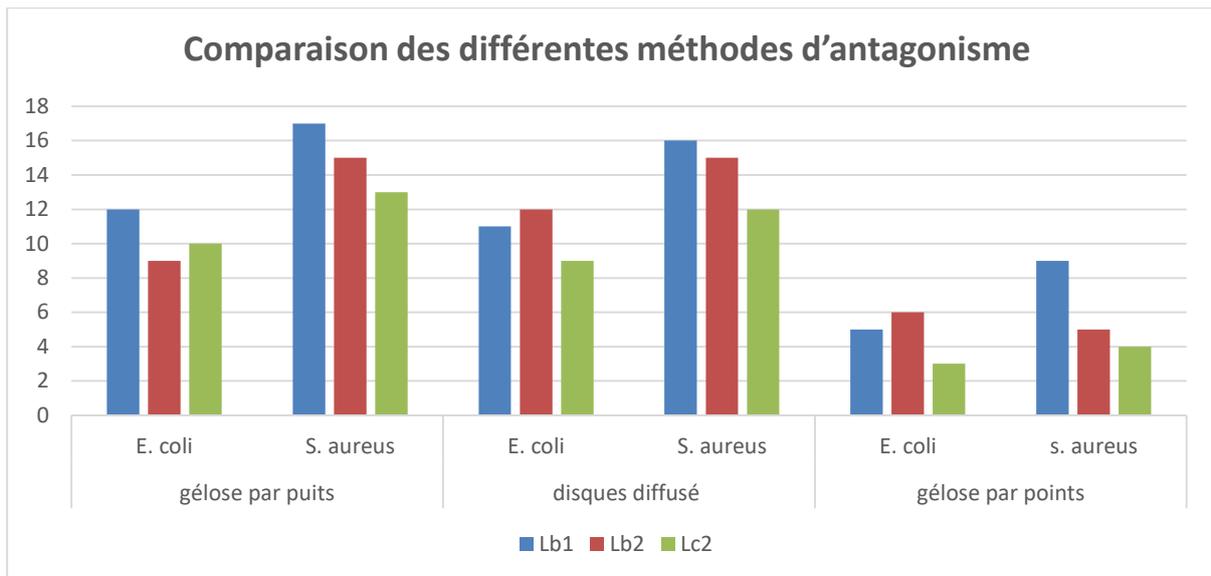


Figure 26: Histogramme illustrant la comparaison des méthodes d'antagonisme



Figure27: Méthode d'antagonisme en puits sur gélose).

Figure28 : Méthode d'antagonisme diffusion de disque).

Figure29 : Méthode d'antagonisme de gélose par points).

Stph : *Staphylococcus aureus*/ *E-coli* : *Escherichia coli*.

4. Discussion

Purification et caractérisation des souches lactique

Dix isolats, sélectionnés sur la base de leur morphologie (couleur crème, forme ovale, diamètre d'environ 0,5 mm), ont été choisis parmi un certain nombre de colonies provenant de souches conservées dans des milieux liquides, après ensemencement du liquide sur gélose MRS/ M17. Tous les isolats conservés dans le milieu MRS se sont révélés être des bâtonnets, tandis que les isolats conservés dans le milieu M17 se sont révélés être en forme de cocci. Tous les isolats lactiques étaient Gram-positifs de forme variée, négatifs pour la catalase et incapables de croître à 45 °C. La variabilité de la morphologie des lactobacilles est notable, allant de longues bacilles droites ou légèrement incurvées à des coccobacilles de type corynéforme. Cette variation est influencée par des facteurs tels que l'âge de la culture, la composition du milieu de culture (par exemple, la disponibilité des esters d'acide oléique), et la tension en oxygène dans l'environnement (Jacques et *al.*, 1980).

Après isolation et purification, les souches lactiques sélectionnées par leur activité antagoniste significative contre les souches cibles, comprenant deux souches de lactobacilles (Lb1 et Lb2) et une souche de lactocoques (Lc2), ont été soumises à des tests complémentaires. Les résultats ont montré des réponses positives pour le mannose, le lactose, le glucose, l'inositol (sauf pour Lb1), le sorbitol, le rhamnose, le saccharose, la mélibiose, l'amygdaline et l'arabinose. Lb1 et Lc2, à l'exception de Lb1, n'ont pas démontré la capacité de produire du gaz à partir du glucose. Lc2 a présenté une fermentation positive de la mélibiose, du mannose et du glucose, mais une réaction négative pour l'inositol, le sorbitol, le saccharose, le rhamnose et l'arabinose. Seule la souche lactique Lc2 a montré une capacité à hydrolyser l'arginine. Cette grande capacité fermentaire polyvalente et flexible des souches Lactiques, de croître sur une grande variété de sources de sucres est déjà mentionnée par des travaux de recherche:

Kleerebezem et *al.*,(2003) amontre que *Lactobacillus plantarum*, isolée des olives de table, est classée parmi les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, qui fermentent les sucres via la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou la voie hexose monophosphate (HMP), conduisant respectivement à des profils de fermentation homolactique et hétérolactique (Kleerebezem et *al.*, 2003). *Lactobacillus plantarum* a dégradé le glucose via la voie EMP pour produire du pyruvate, qui a ensuite été converti en d- et l-lactate par des enzymes lactate déshydrogénase (Liu et *al.*, 2015).

Ce trait phénotypique-biochimique est associé aux gènes codant pour des protéines liées au transport et au métabolisme des glucides. La majorité des transporteurs se trouvent dans le système de phosphotransférase à dépendance phosphoénol pyruvate (PTS). Dans le génome de *L. plantarum* Y44, les gènes pour les complexes EII des familles glucose-glucoside (Glc), fructose-mannitol (Fru), mannose-fructose-sorbose (Man), et lactose-N,N'-diacétylchitobiose- β -glucoside (Lac) étaient présents en plusieurs copies, tandis que les gènes pour les complexes EII des familles galactitol (Gat), l-ascorbate (Asc), et glucitol (Gut) étaient présents en une seule copie. En plus de ceux dans le système PTS, *L. plantarum* Y44 possédait des dizaines d'autres transporteurs de glucides. Les spécificités de substrat du PTS de *L. plantarum* Y44 et d'autres transporteurs de glucides ne pouvaient pas être prédites. Kleerebezem et *al.*, (2003) ont expliqué que certains systèmes de transporteurs de glucides sont connus pour importer plus d'un substrat.

Il est important de noter qu'en raison de ressources limitées, les données issues des tests morphologiques, physiologiques, biochimiques et d'utilisation des sucres ne suffisent pas à confirmer l'identification des espèces conformément au '*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*'. Par conséquent, l'identification s'est limitée au niveau du genre.

Activité Antibactérienne des souches lactiques

Les antagonismes entre les souches lactiques isolées de fruits d'olives de table sont réalisés en opposition à des souches cibles procaryotes à G+ et G-, a été menée *in vitro* et évaluée sur un milieu bactériologique complexe, le Muller Hinton, en tant que support des interactions, dans le but de démontrer l'éventuel potentiel du pouvoir antagoniste de nos souches lactiques.

La méthode employée a été similaire à celle des auteurs mentionnés précédemment (dans la partie méthodes). Elle a consisté à déposer stérilement un volume de 20 μ l d'un SBA* provenant de bouillon de 24 H de la souche lactiques (après avoir été centrifugé et neutralisé le pH à l'aide de NaOH stérile).

Sur milieu gélosé MH, nous déposons stérilement, les disques imbibés de SBA sur le tapie bactérienne (la souche cible), puis sont laissés à diffuser pendant 30min à 4°C, puis on passe à l'incubation à 37°C pendant 24 h. En utilisant cette méthode, qui est simple, en se basant sur la lecture visuelle des diamètres des Z.I (en mm), nous avons pu prévenir les contaminations.

Les bactériocines ont suscité l'intérêt des chercheurs en science alimentaire en tant que bioconservateurs naturels en raison de leur activité antibactérienne contre les bactéries responsables de la détérioration des aliments et les bactéries pathogènes impliquées dans les intoxications alimentaires (Bentoura et *al.*, 2017). L'action de conservation des bactéries lactiques découle de la production d'acide lactique, d'acide acétique, de peroxyde d'hydrogène ainsi que de bactériocines résultant de leur activité métabolique (Cleveland et *al.*, 2002; Gautam et Sharma, 2009).

Les isolats sélectionnés ont montré une activité antibactérienne contre les souches indicatrices avec des valeurs des ZI variables, ces résultats sont consolidés par des études antérieures, montrant que diverses souches lactiques, ont été déjà isolées de différentes sources, telles que lait cru de chèvre dans l'ouest de l'Algérie (Allouche et *al.*, 2010), le jabot et le caecum de la volaille au Brésil (Lima et *al.*, 2006), ainsi que d'autres produits alimentaires tels que les produits laitiers fermentés et la viande, où elles ont montré une activité inhibitrice contre divers pathogènes et bactéries d'altération (Ge et *al.*, 2007; Matamoros et *al.*, 2009).

Les résultats montrent que les souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2 ont une activité antibactérienne notable, la moyenne mesurée par le diamètre de la zone d'inhibition (mm) pour les lactobacilles est de 5.85 mm contre les souches cibles Gram négative, est de 9.35 mm contre les Gram positive. Les lactocoques sont donné des ZI mesurées contre les Gram négative et positive respectivement: 4.4 et 7.8mm. La valeur la plus important a été marquée par: Lb1 et Lb2 (21 mm) contre *E. faecalis*, *S. aureus*. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Carrasco et *al.*, (2002) et Simova et *al.*, (2009). La plupart des souches (3 lactobacilles et 3 lactocoques) ont montré une activité contre *E. coli*, confirmant des résultats antérieurs rapportés par Tulumoglu et *al.*, (2013).

La sensibilité des bactéries Gram-positives et Gram-négatives aux bactériocines des LAB est influencée par la composition de leur paroi cellulaire. La résistance relative des bactéries Gram-négatives est attribuée à la nature particulière de leur enveloppe cellulaire, notamment la présence de lipopolysaccharides, de protéines et de phospholipides, qui permet la diffusion libre de molécules de faible poids moléculaire (<600 Da), tandis que les plus petites bactériocines ont environ 3 kDa (Abeet et *al.*, 1995; Ray et *al.*, 2001). Dans le cas où nos souches lactiques étaient moins résistantes aux souches cibles G (-), on a observé un effet bactéricide, *In Vitro*, contre la souche cible *Vibrio.sp*. Il est possible que cela soit dû aux caractéristiques physiologiques de la souche

Vibrio sp., qui présente un pH de croissance optimal très alcalin (environ 9,5). L'effet bactéricide et/ou inhibiteur du SBA issu des LAB était probablement trop acide, et/ou défavorable à la croissance et à la survie des souches *Vibrio* sp.

Les bactéries lactiques sont connues pour leur production des substances antimicrobiennes, telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du diacétyl et des bactériocines, qui jouent un rôle antagoniste contre les organismes responsables de la détérioration alimentaire et les bactéries pathogènes (Daeschel, 1989; Piard et Desmazeaud, 1992).

A ce titre, plusieurs travaux de recherche ont identifié des composés protéiques, tels que les bactériocines, qui présentent une activité inhibitrice contre un large éventail de souches bactériennes (Klaenhammer, 1993; Bogovic-Matijasic et al., 1998; Cleveland et al., 2001;; Cotter et al., 2005). Ces bactériocines agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores, ce qui entraîne la libération du contenu intracellulaire et la mort de la cellule bactérienne affectée (Klaenhammer, 1993). Cependant, la présence d'un anneau d'inhibition n'implique pas nécessairement la production de bactériocines (Klaenhammer, 1993). Il est donc essentiel de réaliser des tests supplémentaires pour déterminer la nature précise de l'agent inhibiteur. Par exemple, les acides organiques possèdent une activité *in vitro* et *in vivo* contre les micro-organismes pathogènes impliqués dans les cas de diarrhée (Servin, 2004). La baisse du pH peut influencer la viabilité des bactéries pathogènes (Bruno et Shah, 2002; Servin, 2004). D'une part, l'acidification du cytoplasme perturbe l'activité enzymatique des pathogènes sensibles à l'acidité (Deng et al., 1999). D'autre part, elle provoque une perméabilisation de la membrane externe des bactéries à Gram-négatives, facilitant ainsi l'accès à d'autres substances antimicrobiennes comme les bactériocines (Servin et al., 2004). La production de ces composés antimicrobiens est une caractéristique importante des probiotiques, leur permettant de concurrencer et d'exclure la survie des pathogènes dans le tractus intestinal, exprimant ainsi leur effet probiotique chez leurs hôtes (Salminen et al., 1998; Collado et al., 2005).

Dans le domaine d'industrie agroalimentaire, les souches produisant des bactériocines sont utilisées dans les cultures de départ (Starter) pour la fabrication du fromage afin d'améliorer sa sécurité et sa qualité, et récemment, elles sont ajoutées avec des cultures adjointes sensibles pour accélérer l'affinage du fromage (Delves-Broughton et al., 1996; Ross et al., 1999).

Réalisation des antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés conformément aux normes recommandées par le standard d'antibiogramme (CLSI, 2014 ; l'EFSA FEEDAP Panel et *al.*, (2018).

Les souches lactiques ont été sélectionnées en raison de leur activité antibactérienne. Par conséquent, toutes les souches ayant démontré une activité inhibitrice positive contre les souches cibles, ont été soumises à l'antibiogramme.

Il est bien connu que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques qui inhibent la synthèse des acides nucléiques (à l'exception de la ciprofloxacine) et la synthèse des protéines (à l'exception des aminoglycosides), ainsi qu'aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire (à l'exception de la vancomycine) (Ammor et *al.*, 2007; Danielsen et Wind, 2003; Hummel et *al.*, 2007; Kirtzalidou et *al.*, 2007). Les lactobacilles, pédiocoques et *Leuconostoc.spp* ont été signalés comme ayant une résistance naturelle élevée à la vancomycine, propriété utile pour les distinguer des autres bactéries à Gram positif (Hamilton-Miller et Shah, 1998; Simpson et *al.*, 1988).

Selon Danielsen et Wind (2003), La bacitracine, la céfoxitine, la ciprofloxacine, l'acide fusidique, la kanamycine, la gentamicine, le métronidazole, le nitrofurantoïne, la norfloxacine, la streptomycine, la sulfadiazine, la teicoplanine, le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la vancomycine sont des ATB à laquelle certains lactobacilles résistent naturellement.

Les souches bactériennes isolées, ont montré un degré variable de résistance à la plupart des antibiotiques testés. En effet, dans notre étude, 87.3 % des souches lactiques testées étaient sensibles à la tétracycline et à l'érythromycine, et 80 % des souches étaient sensibles au chloramphénicol.

Tous les huit isolats ont montré une résistance à la vancomycine et à la kanamycine. Concernant la tétracycline un isolat (Lb1) était sensible vis-à-vis d'un antibiotiques, tandis qu'un autre (Lb2) avait montré une résistance intermédiaire. Pour l'érythromycine, quatre isolats (Lb1, Lb4, Lb7) ont montré une haute résistance, un isolat (Lc) avait montré une résistance intermédiaire.

Cette variabilité de résistance des souches LAB, est bien décrit dans des résultats de recherches antérieures pour: Les souches lactiques telles que *Lactobacillus*, *Les Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* par des mécanismes telle que: l'inactivation enzymatique des antibiotiques, la restriction de l'importation d'antibiotiques, l'exportation active

d'antibiotiques ou la modification de la souche cible sont parmi les mécanismes de résistance utilisés (Davies, 1997).

La plupart des espèces sont résistantes au métronidazole, puisqu'elles n'ont pas d'activité hydrogénase (la cible de l'agent) (Danielsen et Wind, 2003; Delgado et al., 2005; Flórez et al., 2005). En général, elles présentent une résistance aux sulfamides et au triméthoprim (Charteris et al., 1998b; Katla et al., 2001). La sensibilité des LAB et des bifidobactéries à la pipéracilline et à la pipéracilline plus la tazobactam est élevée (Delgado et al., 2005; Flórez et al., 2005; Moubareck et al., 2005).

La résistance aux niveaux élevés de céfoxitine est observée chez les espèces *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* (Charteris et al., 1998b; Delgado et al., 2005; Florez et al., 2005), alors que les espèces *Bifidobacterium* sont très sensibles (Delgado et al., 2005). La majorité des *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* peuvent faire face (résistance) à des niveaux élevés de vancomycine, alors que la plupart des isolats de *Lactococcus* sont très sensibles (Danielsen et Wind, 2003; Delgado et al., 2005; Florez et al., 2005). Selon Klein et al., (2000), les espèces *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont résistantes à la vancomycine en raison de la présence de D-Ala D-Lactate dans leur peptidoglycane plutôt que du dipeptide D-Ala – D Ala. Quant aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire, les lactobacilles sont habituellement sensibles aux pénicillines (pipéracilline et ampicilline) et aux inhibiteurs de la β -lactamase, mais plus résistants à l'oxacilline et aux céphalosporines (céfoxitine et ceftriaxone) (Coppola et al., 2005; DanielsenWind, 2003).

Déjà, les résistances des LAB à la tétracycline et/ ou à l'érythromycine dans notre étude, ont été observés dans des études antérieures (Anisimova et Yarullina, 2018; Danielsen et Wind, 2003; Gevers et al., 2003; Gueimonde et al., 2013; Mayrhofer et al., 2010). Les gènes codant pour ces résistances sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides conjugatifs et des transposons (Ammor et al., 2008; Devirgiliis et al., 2009; Feld et al., 2008; Mendonça et al., 2016; Nicoloff et al., 2003). Par conséquent, la détection de résistances à la tétracycline et à l'érythromycine dans les souches bactériennes utilisées pour des applications alimentaires et agricoles, constitue un risque de propagation des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

Les déterminants les plus courants de la résistance à la tétracycline chez les lactobacilles sont les gènes *tet* (K, M, O, Q, S, W, 36), qui peuvent parfois se combiner (Ammor et al., 2008; Gueimonde et al., 2013). La sensibilité maximale a été observée

pour le chloramphénicol, tandis que la résistance à la vancomycine celle-ci est une propriété inhérente et non transférable entre espèces ou genres (D'Aimmo *et al.*, 2007). Ainsi, la résistance observée à la vancomycine dans cette étude n'était pas inattendue. Des études précédentes ont également noté une haute résistance aux aminoglycosides tels que la kanamycine et la gentamicine chez les lactobacilles (Kirtzalidou *et al.*, 2011; Fukao *et al.*, 2012).

Selon Herreros *et al.*, (2005), La résistance bactérienne à ces médicaments, pourrait être principalement due à une utilisation excessive d'antibiotiques dans les traitements et la prophylaxie des infections bactériennes, ce qui pourrait expliquer les niveaux élevés observés par les souches étudiées par rapport à de nombreux antimicrobiens.

Des tests de sensibilité aux antibiotiques ont été effectués sur les souches cibles à Gram négatifs et à Gram positive en utilisant la méthode de diffusion sur disque de Kirby-Bauer avec 11 disques contenant différents antibiotiques. La plupart des souches ont montré une sensibilité à la nitrofurantoïne, à l'amikacine et au cotrimoxazole. Nos résultats sont en accord avec ceux de Panta *et al.* (2013). Pour *E. coli*, les résultats de notre étude montrent que parmi les 11 antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme, 9 sont efficaces (95 %). La ciprofloxacine était le médicament le plus efficace, tandis que la nitrofurantoïne est le moins efficace contre *Klebsiella* spp. Le cotrimoxazole, le chloramphénicol et la ciprofloxacine se sont révélés être les médicaments les plus efficaces. Les souches ont toutes montré une sensibilité à l'imipénème, et aucune bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) n'a été détectée.

L'antibiogramme des souches cibles à Gram positives présentes des profils de résistance variés. *S. aureus* est sensible à l'oxacilline, indiquant qu'il ne s'agit pas d'une souche SARM. Cependant, cette souche est résistante à la lévofloxacine et à l'ofloxacine, montrant une résistance non liée à la méthicilline, Selon Daurel *et al.* (2008), *Streptococcus pyogenes* est résistant à l'oxacilline, à la vancomycine et à la clindamycine, avec une sensibilité intermédiaire à l'érythromycine et à la tétracycline, mais sensible aux autres antibiotiques testés. *Enterococcus faecalis* présente une sensibilité intermédiaire à l'érythromycine, à la rifampicine, à la clindamycine et à la gentamicine, et résiste à la vancomycine, mais reste sensible aux autres antibiotiques. Ces résultats mettent en

évidence l'importance des tests de sensibilité pour guider le traitement des infections bactériennes.

Effets de la température et du temps de stockage sur l'activité Antibactérien

Neutralisation des surnageants:

On a réussi à neutraliser le pH de milieu en neutralisant l'effet inhibiteur des acides organiques dans les surnageants en utilisant une solution de NaOH de 0,1N jusqu'à obtenir un pH neutre (pH=7) (Tabak et Bensoltane, 2011).

La stabilité à haute température d'un matériau bio-conservateur le rend approprié pour une utilisation en conservation alimentaire (Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008). Il a été observé que l'activité antilistérienne des différents (SBA) subit une perte modérée d'activité après exposition à des températures élevées (Hartmann et al., 2011). Dans cette étude, le traitement de tous les SBA à différentes températures a montré que l'activité antibactérienne résiduelle reste stable pour les souches Lb1 et Lb2, avec une perte modérée pour Lc2. Ces résultats indiquent la présence de protéines thermostables dans les SBA; des études antérieures montrent que les basses températures (25°C, 60°C et 80°C) n'ont aucun effet néfaste sur les SBA des souches *L. plantarum* (Zamani et al., 2017). De plus, les SBA d'*Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 sont partiellement affectés par la température (de Las M Cardoso, Manzo, Tonarelli, & Simonetta, 2012).

L'effet du temps et de la température de stockage sur l'activité antibactérienne des bactériocines extraites a été étudié. Montre que l'effet du stockage à 37°C sur la stabilité des bactériocines des souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2. L'effet a été mesuré contre *Staphylococcus aureus* et *E. coli* par la méthode de diffusion en puits d'agar pendant 2 mois à intervalles de 15, 30 et 60 jours. La zone d'inhibition des bactériocines des souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2 a progressivement diminué après 30 jours de stockage. Après 60 jours à 37°C, l'activité des bactériocines extraites était complètement perdue. Banerjee et al. (2013) ont rapporté des résultats similaires avec les bactériocines de *L. brevis* FPTLB3, dont la stabilité a diminué après 20 jours de stockage à 37°C. Malini et Savitha (2012) ont également observé que l'activité des bactériocines extraites de *L. acidophilus* NCIM5426 diminuait après 20 jours de stockage à 32°C.

L'effet du stockage à -20°C sur l'activité antibactérienne des bactériocines extraites est présenté dans le Tableau XI. L'activité des bactériocines est restée stable jusqu'à 60 jours

de stockage à -20°C. Les diamètres des zones d'inhibition des bactériocines des souches Lb1, Lb2 et Lc2 sont restés constants après 30 et 60 jours. Cependant, après 60 jours de stockage, l'activité n'était plus détectable. Ces résultats concordent avec ceux de Corsetti et al. (2004), qui ont constaté que l'activité des bactériocines produites par les lactobacilles était stable pendant au moins 2 mois en congélation. De plus, Ogunbanwo et al. (2003) ont rapporté que les bactériocines produites par *L. brevis* OG1 et *L. plantarum* sont restées pleinement stables après 60 jours de stockage à -20°C. Le stockage de la substance active produite par *L. acidophilus* DSM 20079 à 4°C pendant plus de 2 mois et à -20°C pendant plus de 6 mois n'a également pas influencé l'activité (Deraz, 2005). Ces résultats indiquent que le stockage à -20°C est la température la plus appropriée pour conserver les bactériocines.

Exploration des méthodes d'antagonisme : Comparaison et Évaluation

L'activité antagoniste contre deux souches indicatrices (pathogènes), à savoir *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, a été testée en utilisant trois isolats de bactéries lactiques (Lb1, Lb2 et Lc2). Grâce au test de diffusion en puits sur l'agar, les trois souches ont démontré des activités inhibitrices contre tous les SC testés, bien que les degrés d'inhibition varient. Des zones d'inhibition plus larges, allant de 15,0 mm à 20,0 mm, ont été observées avec les isolats de LAB contre *Staphylococcus aureus*. En revanche, les zones d'inhibition contre *Escherichia coli* étaient plus réduites, allant de 12,5 mm à 17 mm.

Des résultats similaires ont été obtenus avec la méthode des disques imprégnés, où les zones d'inhibition des isolats de LAB contre *Staphylococcus aureus* variaient de 14 mm à 19 mm, pour *Escherichia coli*, les zones d'inhibition allaient de 11,5 mm à 17 mm. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Heredia-Castro et al. (2015).

Le test de point dans l'agar a montré des zones d'inhibition plus petites, allant de 3 mm à 7 mm, contre les souches cibles qui avaient montré des zones d'inhibition plus large avec la technique de diffusion en puits dans l'agar. Ces observations corroborent les résultats d'Armas et al. (2017), qui ont récemment rapporté des activités similaires des souches de LAB contre divers pathogènes en utilisant le test de point dans l'agar.

Conclusion

Cette étude a permis, en plus de caractériser, de recueillir des données précieuses sur 12 souches LAB qui ont été récupérées, revivifiées ou réactivées, puis purifiées et caractérisées après avoir été conservées par cryoconservation pendant deux années (depuis juin 2022). Ces souches, impliquées dans la fermentation des olives de table noires, ont été identifiées comme ayant des propriétés probiotiques et bacteriocinogènes.

Trois souches lactiques spécifiques (Lb1, Lb2 et Lc2) étudiées pour leur capacité à fermenter différents glucides, ont montré un large spectre d'activité antibactérienne contre les agents pathogènes et les souches responsables de l'altération alimentaire.

De plus, elles ont présenté un profil potentiellement bacteriocinogène, avec des effets inhibiteurs principalement dirigés contre des souches cibles à paroi Gram positive, en raison de leur phylogénie et du mode d'action des bactériocines des LAB.

Par ailleurs, ces souches ont démontré une stabilité de leurs effets inhibiteurs dans différentes conditions, notamment à des températures variables (de 25°C à 120 °C) et lors de périodes de conservation prolongées jusqu'à deux mois (à des températures de 4 à -20°C). Ces caractéristiques confèrent une importance biotechnologique significative à ces souches bactériennes dans les processus de fermentation et de conservation des aliments. Parallèlement, une multi-résistance phénotypique a été observée pour la plupart des souches de *Lactobacillus* testées, soulignant ainsi la nécessité de prêter une attention particulière à l'utilisation sûre de ces lactobacilles dans les aliments et à leur potentiel de propagation de la résistance dans l'environnement.

Références bibliographiques

Les references:

- (I.O.O.C). Updates Series of World Statistics on Production, Imports, Exports and Consumption. (2018). Retrieved from https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/production3_ang.pdf.
- Abeet A., Knock L. and Hill C. (1995). Bactériocines: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. foodmicrobial*, 28: 169-185.
- Allouche, F. N., Hellal, A., & Laraba, A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature & Technology*, (3), 13.
- Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J. J., Uceda, M., & Mesa, M. D. (2010). Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclotriterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2885-2890.
- Amaral, R.C., Carvalho, B.F., Costa, D.M., Morenz, M.J.F., Schwan, R.F., & Avila, C.L.S. (2020). Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiacu. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 114472.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24(6), 559-570.
- Ammor, M. S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., van Hoek, A. H., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Mayo, B., & Margolles, A. (2008). Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried tet(L) and chromosomally located transposon-associated tet(M), coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1394–1401.
- Anisimova, E., & Yarullina, D. (2018). Characterization of erythromycin and tetracycline resistance in *Lactobacillus fermentum* strains. *International Journal of Microbiology*. are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- Armas, F., Camperio, C., & Marianelli, C. (2017). In vitro assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. *PLoS One*, 12(1), e0169543.
- Banerjee, S. P., Dora, K. C., & Chowdhury, S. (2013). Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 17–25.
- Bentoura, A., Amiali, M., Aissiou, M. Y. E. A., & Bitam, A. (2017). Antagonistic effect of lactobacilli isolated from camel (*Camelus dromedarius*) milk on food borne pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 11(17), 673-680.
- Bogovič-Matijašić, B., Rogelj, I., Nes, I. F., & Holo, H. (1998). Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 606-612.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., et al. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 87-97.

- Breithaupt, D. E., Schwack, W., Wolf, G., & Hammes, W. P. (2001). Characterization of the triterpenoid 4,4'-diaponeurosporene and its isomers in food-associated bacteria. *European Food Research and Technology*, 213(3), 231-233.
- Bruno FA. and Shah NP. (2002). Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*. 57: 617-621.
- Buncic, S., Avery, S. M., & Moorhead, S. M. (1997). Insufficient antilisterial capacity of low inoculum *Lactobacillus* cultures on long-term stored meats at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), 157–170.
- Carrasco, M. S., Scarinci, H. E., & Simonetta, A. C. (2002). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinean dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 15-19.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636-1643.
- Cleveland, J., Chikindas, M. L., & Montville, T. J. (2002). Multi-method assessment of commercial nisin preparations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 228–232.
- 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.
- Collado, M. C., Gueimonde, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2005). Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2672–2678.
- Collins EB., Hall BJ. (1984). Growth of bifidobacteria milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. *Journal of Dairy Sciences* 67(7):1376–80.
- Cook RD, Twiddy DR, Reilly PJA. Lactic acid fermentation as a low cost means of food preservation in tropical countries *FEMS, Microbiol Rev* 1987; 64; 369-79.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., & Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*, 85(3), 193-204.
- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., & Gobbetti, M. (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95–104.
- Corsetti, A., Settanni, L., & Van Sinderen, D. (2004). Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 521-534.
- Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777- 788.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43, 164-167.

- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., & Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 35-42.
- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1-11.
- Daurel, C., & Leclercq, R. (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des laboratoires*, 2008(407), 81-90.
- De Las M Cardoso, M., Manzo, R. M., Tonarelli, G. G., & Simonetta, A. C. (2012). Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 568-577.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire* (pp. 128, 129, 269, 271). Edition Lavoisier.
- Delgado, S., Florez, A.B., Mayo, B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.* 50, 202-207.
- Deng, S. P., & Tabatabai, M. A. (1994). Cellulase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(10), 1347-1354.
- Deng Y., Ryu JH. and Beuchat LR. (1999). Tolerance of acid adapted and non adapted *Escherichia coli* O157:H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *J Appl Microbiol.* 88: 203-210.
- Deraz, S., Karlsson, N. E., Hedström, M., Andersson, M. M., & Mattiasson, B. (2005). Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM20079. *Journal of Biotechnology*, 117(3), 343-354.
- Deshpande, K. D., Pichare, A. P., Suryawanshi, N. M., & Davane, M. S. (2011). Antibiogram of gram negative uropathogens in hospitalized patients. *Int J Recent Trends Sci Technol*, 1(2), 56-60.
- Desmazeaud, M. (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahiers agricultures*, 5(5), 331-343.
- Devirgiliis, C., Coppola, D., Barile, S., Colonna, B., & Perozzi, G. (2009). Characterization of the Tn916 conjugative transposon in a food-borne strain of *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 3866-3871.
- Domingos-Lopes, M. F., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L., & Silva, C. C. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63, 178-190.
- Dublanchet, A., Durieux, R., & Fevre, D. (1977). Sensibilité des bactéries anaérobies au Métronidazole: Intérêt pratique de l'antibiogramme par la méthode des disques. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 7(7), 317-322.
- EFSA FEEDAP Panel, Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., Lopez-Alonso, M., Lopez Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B.,

- Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., Wallace, R. J., Wester, P., Glandorf, B., Herman, L., Karenlampi, S., Aguilera, J., Anguita, M., Brozzi, R., & Galobart, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16(e05206).
- El-Soda, M., El-Ziney, M., Awad, S., Osman, G., Omran, N., Gamal, G., Ezzat, N., & El-Shafei, H. (2003). A culture collection of lactic acid bacteria isolated from raw milk and traditional Egyptian dairy products. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 31, 23–41.
- Feld, L., Schjorring, S., Hammer, K., Licht, T. R., Danielsen, M., Krogerfelt, K., & Wilcks, A. (2008). Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4), 845–852.
- Flórez, A. B., Egervärn, M., Danielsen, M., Tosi, L., Morelli, L., Lindgren, S., & Mayo, B. (2005). Susceptibility of *Lactobacillus plantarum* strains to six antibiotics and definition of new susceptibility–resistance cutoff values. *Microbial Drug Resistance*, 12(4), 252–256.
- Fonseca, F. (2001). Influence de la cryoprotection et de la congélation sur l'activité acidifiante de bactéries lactiques thermophiles. Relations entre propriétés biologiques et thermodynamiques (Doctoral dissertation, Institut national agronomique Paris-Grignon (1971-2006)).
- Fukao, M., & Yajima, N. (2012). Assessment of antibiotic resistance in probiotic lactobacilli. *Antibiotic Resistant Bacteria—A Continuous Challenge in the New Millennium*, 503–512.
- Garvie E.I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *In: Methodes in Microbiology volume 16. Academicpress London: 147-178.*
- Gautam, N., & Sharma, N. (2009). Bacteriocin: Safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology*, 49(2), 204–211.
- Ge, B., Jiang, P., Han, F., Saleh, N. K., Dhiman, N., & Fedorko, D. P. (2007). Identification and antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria from retail fermented foods. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2606–2612.
- Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., & Swings, J. (2003). Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1270–1275.
- González, C. J., Encinas, J. P., García-López, M. L., & Otero, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17, 383–391.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de Los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 202.
- Guessass B (2007). Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat. Université d'Oran EsSenia. Algérie.
- Guiraud J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-292, 140-141.

- Hamilton-Miller, J. M. T., & Shah, S. (1998). Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology*, 27(2), 121-121.
- Harrigan, W. F., & McCance, M. E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press.
- Harris, J.A., Benedict, R.C., Hoffmann, G.J., & Hunter, A.G. (1989). Agar plate method for screening lactic acid bacteria for antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1290- 1298.
- Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-producing lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* on fresh pork and poultry. *Food Control*, 22(8), 1465-1470.
- Hassaine O.(2013). caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien.
- Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of dairy science*, 98(12), 8285-8293.
- Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22(5), 455-459.
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730–739.
- Hu, X., Mao, R., Zhang, Y., Teng, D., Wang, X., Xi, D., ...& Wang, J. (2014). Biotechnical paving of recombinant enterocin A as the candidate of anti-*Listeria* agent. *BMC Microbiology*, 14, 1-11.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food microbiology*, 31(1), 1-8.
- Hutkins, R. W. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Hoboken: Wiley Blackwell.
- Jacques, N. A., Hardy, L., Knox, K. W., & Wicken, A. J. (1980). Effect of Tween 80 on the morphology and physiology of *Lactobacillus salivarius* strain IV CL-37 grown in a chemostat under glucose limitation. *Microbiology*, 119(1), 195-201.
- Jose, N. M., Bunt, C. R., & Hussain, M. A. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3, 198–212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198>.
- Katla, A.K., Kruse, H., Johnsen, G., Herikstad, H., 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 147–152.
- Kirby-Bauer A. (1966). L'antibiogramme.45 : 493-496.

- Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M., & Kyriacou, A. (2011). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, 17(6), 440–443.
- Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M., & Kyriacou, A. (2007). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, 17(6), 440–443.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (2000). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103-125.
- Klaenhammer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMSMicrobioRev*, 12: 39-86.
- Klaenhammer TR. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS MicrobiolRev*. 12: 39-85.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W. E. J., Stiekema, W., Lankhorst, R. M. K., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M., & Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1990–1995.
- Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.
- Leveau J-Y., Bouivenrielle, De Roissart H. (1991). La flore lactique In technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires Bourgeois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, 152 p.
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1980). *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires..* 3eme édition. Tec & Doc, Lavoisier. Paris ; P 106.193.
- Lima, E. T., Andreati Filho, R. L., Okamoto, A. S., Noujaim, J. C., Barros, M. R., & Crocci, A. J. (2006). Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 71(1), 103-107.
- Malini, M., & Savitha, J. (2012). Heat stable bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from locally available cheese: An in vitro study. *E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 3(2), 28-41.
- Mayrhofer, S., van Hoek, A. H. A. M., Mair, C., Huys, G., Arts, H. J. M., Kneifel, W., et al. (2010). Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 81–87.
- Maragkoudakis, P., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189–199.
- Marchal N., Bourdon J. and Richard C. L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*. p. 65-149.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., et al. (2017). Health benefits of fermented foods:

- microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94- 102.
- Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prévost, H., & Leroi, F. (2009). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 26(6), 638-644.
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281-295.
- McGowan, M. P., & Artchoker, J. (2009). Susceptibility of probiotic lactobacilli to antibiotics. *Bioscience Horizons*, 2(2), 145-151.
- Mendonça, A. A., de Lucena, B. T., de Morais, M. M., & de Morais, M. A. Jr. (2016). First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vini* that spread the tet-M resistance gene. *FEMS Microbiology Letters*.
- Moubareck, C., Bourgeois, N., Courvalin, P., & Doucet-Populaire, F. (2005). Multiple antibiotic-resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2993–2996.
- Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucet-Populaire, F., 2005. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 38–44.
- Mueller, T., & Fox, C. (2010). Bacteriocins in probiotic research and applications. *Probiotics*, 65-79.
- Nes, I.F., Kjos, M., & Diep, D.B. (2012). Antimicrobial components of lactic acid bacteria. In S. Lahtinen, S. Salminen, A.C. Ouwehand, & A. Von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria – Microbiological and Functional Aspects* (pp. 1–16). Boca Raton, FL: CRC Press – Taylor & Francis Group.
- Nicoloff, H., & Bringel, F. (2003). ISLp11 is a functional IS30-related insertion element in *Lactobacillus plantarum* that is also found in other lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6032–6040.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I., & Onilude, A. A. (2003). Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(7), 179-184.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A., & Onilude, A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.
- Panta, K., Ghimire, P., Rai, S. K., Mukhiya, R. K., Singh, R. N., & Rai, G. (2013). AntibioGram typing of gram negative isolates in different clinical samples of a tertiary hospital. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(1), 153-156.
- Papadelli, M., Zoumpopoulou, G., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Manolopoulou, E., Lytra, I., Papadimitriou, K., & Tsakalidou, E. (2015). Evaluation of two lactic acid bacteria starter cultures for the fermentation of natural black table olives (*Olea Europaea* L cv Kalamon). *Polish Journal of Microbiology*, 64, 265– 271. doi:10.5603/PJM.2015.0026.

- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advanced Journal of Food Science and Technology*, 2(2), 138-144.
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 396129.
- Ruiz-Barba J. L, Cathcart D. P., Warner P. J, Jimenez-Diaz R., (1994), Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish style green olive fermentations, *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 60, No.6, p. 2059- 2064.
- Ruiz-Barba, J.M. Piard, J.C. and Jiménez-Díaz, R. (1991) Plasmid Profiles and Curing of Plasmids in *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Green Olive Fermentation. *J. Appl. Bacteriol.*, 71 (1991), 417- 421.
- Ross, P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S., Ryan, M., Twomey, D., Meaney, W., & Hill, C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72, 1.
- Saarisalo, E., Skytta, E., Haikara, A., Jalava, T., & Jaakkola, S. (2007). Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 327- 336.
- Salminen, S., & Wright, A. (1998). *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc. a. Sankarankutty, J., & Kaup, S. (2014). Distribution and antibiogram of gram negative isolates from various clinical samples at a Teaching Hospital, Tumkur. *Blood*, 9, 55-55.
- Sankarankutty, J., & Kaup, S. (2014). Distribution and antibiogram of gram negative isolates from various clinical samples at a Teaching Hospital, Tumkur. *Blood*, 9, 55-55.
- Schachtsiek, M., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2004). Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7078-7085.
- Schillinger, U., & Lucke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1901-1906.
- Servin A.L.(2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 28: 405-440.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Parolin, C., NahuiPalomino, R. A., Vitali, B., & Lanciotti, R. (2017). Determination of antibacterial and technological properties of vaginal lactobacilli for their potential application in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 166.
- Simpson, W.J., Hammond, J.R.M., Miller, R.B., 1988. Avoparcin and vancomycin—Useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 64, 299 – 309.
- Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18(4), 329-343.

- Sorrentino, G., Muzzalupo, I., Muccilli, S., Timpanaro, N., Russo, M.P., Guardo, M., Rapisarda, P., & Romeo, F.V. (2016). New accessions of Italian table olives (*Olea europaea*): Characterization of genotypes and quality of brined products. *Scientia Horticultura*.
- Tadesse, G., Ephraim, E., & Ashenafi, M. (2005). Assessment of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity. *Internet Journal of Food Safety*, 5, 13-20.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker, 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in microbiology*, 7, 181961.
- Terzaghi, B. K., & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Applied Bacteriology*, 29, 807.
- Tulumoglu, S., Yuksekdog, Z. N., Beyatli, Y., Simsek, O., Cinar, B., & Yaşar, E. (2013). Probiotic properties of lactobacillus species isolated from children's feces. *Anaerobe*, 24, 36-42.
- Therdatha, P., Tandumrongpong, C., Pilasombut, K., Matsusaki, H., Keawsompong, S., & Nitisinprasert, S. (2016). Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling. *SpringerPlus*, 5(1), 1060.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., & Reinheimer, J. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1678-1688.
- Wang, Y., Yan, F., Wang, Y., Chen, X., & Li, H. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* F0211. *Food Control*, 21(5), 695-701.
- Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. (2015). Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell*, 161(1), 49-55.
- Zamani, H., Rahbar, S., Garakoui, S. R., Afsah Sahebi, A., & Jafari, H. (2017). Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell-free supernatant (CFS) against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(2).

Les annexes

Annexe I:

1. Matériels

1.1. Matériel lourd

Matériel	Référence
Hotte microbiologique	STERIL-GEMINI (Italy)
Autoclave	SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J- Turkish
Etuves	Memment (Germany)
Microscope optique	OPTIKA B-350 (Italy)
Compteur de colonies	J.P.SELECTA,s.a (Spain)
Bain marie	Memmen (Germany)
Réfrigérateur / Congélateur	Samsung®, Algérie
Vortex	Fisher Scientific FB 15024
Agitateur magnétique plaque chauffante	AGIMATIC-E
Bec Bunsen électrique	INTEGRA Biosciences®, model FIREBOY eco, becBunsens
Spectrophotomètre	JENWAY 7315
Autoclave	SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J
Balance de précision	KERN ALS 220-4N (Germany)
Four Pasteur	Memment type UNB400 Germany
Distillateur	BuchI Distillation Unit K-350 (Switzer land)

1.2. Matériel léger et accessoires

Accessoires	Verrerie	Solvants	Colorants et réactifs	Sels et tampons
Anses de platine, Barreau magnétique, Boîtes de Pétri, Cuillère, Distributeur, Micropipette, Papier Josef, Papier aluminium, Ciseau, Pince, Pissette, Poires. Portoir, Rubans de parafilm, Scotch, Spatules.	Béchers, Burette Entonnoirs, Eprouvette graduées, Erlenmeyers, Fioles Jaugé, Flacons, Lames/lamelles, Pipettes graduées, Pipettes Pasteur, Tubes à essai, Mortie	Alcools (éthanol à 95°), Glycérol, Tween 80	Violet de Gentiane, Lugol, Fushine, Huile à émersion, Phénolphtaléine.,	NaCl, NaOH, KOH, Hcl

b. Les souches cibles

Souches Bactériennes	Caractéristiques (Gram)	Origine
<i>Escherichia coli</i>	G -	Liquide d'ascite
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G -	Urine (ECBU)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	G -	Urine (ECBU)
<i>Salmonella enterica</i>	G -	Eaux potable (Control)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G-	Eaux potable (Control)
<i>Vibrio.sp</i>	G-	Eaux potable (Control)
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	Plaie (infection)
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	Voies urinaires (ECBU)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G +	Plaie infectée
<i>Streptococcus pyogenes</i>	G +	Liquide d'articulation

Annexe II :

Milieux de culture

Milieu de culture	Composition
Gélose MRS	Polypeptone.....10g Extrait de viande.....10g Extrait de levure.....05g Glucose.....20g Tween 801,08ml Phosphate bipotassique.....02g Acétate de sodium trihydraté.....05g Citrate d'ammonium.....02g Sulfate de magnésium.....0,05g Agar.....15,00g
Gélose M17	Tryptone.....02,5g Peptone pepsique de viande.....02,5 g Peptone papainique de soja.....5,0 g Extrait autolytique de levure.....2,5 g Extrait de viande.....5,0g Lactose.....5,0 g

	Glycérophosphate de sodium.....19,0 g Sulfate de magnésium.....0,25 g Acide ascorbique.....0,50g Agar.....15,0
Mueller Hinton (MH)	Hydrolysate acide de caséine.....17,5g Extrait de viande.....03g Amidon.....1.5g Agar16g
Bouillon MRS	Dextrose.....20g Peptone bactériologies.....10g Extrait de bœuf.....8g Acétate de sodium.....5g Extrait de levure.....4g Phosphate di potassique.....2g Citrate d'ammonium.....2g Tween 80.....1ml Sulfate de magnésium.....0.2g Sulfate de manganèse.....0.05g Saccharose.....5g
Bouillon M17	Tryptone.....2.5g Peptone pepsique de viande.....2.5g Peptone papainique de soja.....5.0g Extrait de viande.....5.0g Extrait autolytique de levure.....2.5g Acide ascorbique.....0.5g Glycérophosphate de sodium.....19g Sulfate de magnésium.....0.25g
Eau physiologique	Chlorure de sodium.....9g Eau distillée.....1000ml
Eau peptonnée	Sodium Glycérophosphate.....19.0g Peptone de soja.....5.0g Extrait de viande.....5.0g Lactose.....5.0g Peptone de viande.....2.5g Peptone de caséine.....2.5g

	Extrait de levure.....2.5g Acide ascorbique.....0.5g Sulfate de magnésium.....0.25g Agar bactériologique.....12.75g
Bouillon nutritif (BN)	Extrait de levure.....04g Tryptone.....05g Glucose.....50.0g Dihydrogénophosphate de potassium.....0.55g Chlorure de potassium.....0.425g Chlorure de calcium.....0.125g Sulfate de magnésium.....0.125g Chlorure ferrique.....0.0025g Sulfate de manganèse.....0.0025g Vert de bromocrésol.....0.022g
Milieu Hektoen	Peptones15,0g saccharose14,0g lactose14,0g salicine..... 2,0g chlorure de sodium5,0g thiosulfate de sodium5,0g citrate ferrique ammoniacal (III)..... 1,5g sels biliaires..... 2,0g bleu de bromothymol0,05g fuchsine acide..... 0,08g agar-agar13,5g
Chromagar Orientation	Agar.....15,0g. Peptone et extrait de levure.....17,0g. Mix chromogénique.....1g.

Gélose au sang (BA pour Blood Agar)	Peptone.....15g. Digestat de foie.....2,5g. Extrait de levure.....5g. Chlorure de sodium.....5g. Agar12g. Eau distillée.....1000ml. Sang de cheval (code 355-6641). Sang de mouton (code 355-6652).
Chapman	Peptones10,00g. Extrait de viande de bœuf1,00g. D-mannitol..... 10,00g. Chlorure de sodium75,00g. Rouge de phénol0,025g. Agar15,00g. pH final à 25°C :7,4 ± 0,2.
GNAB (Gélose Nutritive Alcaline Biliée).	Peptone de viande.....10g. Extrait de viande.....3g. Chlorure de sodium.....5g. Bile de bœuf desséchée.....2g. Agar.....18g. pH 8,6.
Gélose Nutritive (GN).	Peptone5,00g. Extrait de viande de bœuf3,00g. Chlorure de sodium..... 5,00g. Agar..... 15,00g. pH final à 25°C : 7,3 ± 0,2

Annexe III

1. Les antibiotiques tester contre les souches lactiques

ANTIBIOTIQUES	ABREVIATION
ERYTHROMYCINE	E
LEVOFLOXACINE	LEV
CHLORAMPHENICOLE	C
VANCOMYCINE	VA
TÉTRACYCLINE	TE
PENICILLINE	P
CLINDAMYCINE	DA/CC
GENTAMYCINE	CN
KANAMYCINE	K / AK

2. Les antibiotiques tester contre les souches cibles (G+ et G-)

LES BACTERIES A GRAM -		LES BACTERIES A GRAM +	
ANTIBIOTIQUES	ABREV.	ANTIBIOTIQUES	ABREV.
CEFAZOLINE	CZ	ERYTHROMYCINE	E
CEFTAZIDIME	CAZ	CHLORAMPHENICOLE	C
ERTAPINEME	ETP	VANCOMYCINE	VA
AMIKACINE	AK	OFLOXACINE	OFX
GENTAMICINE	GN	LEVOFLOXACINE	LEV
CIPROFLOXACINE	CIP	RIFAMPYCINE	R
AMOXCILAVE	AMC	TÉTRACYCLINE	TE
FOSFOMYCINE	FF	CIFOTAXIME	CTC
CHLORAMPHENICOLE	C	PENICILLINE	P
FURANES(NUTROFU)	F	OXACILLINE	OX
TRIMÉTHOPRIME	SXT	GENTAMYCINE	GN
SULFAMIDE		CLINDAMYCINE	DA
<i>PSEUDOMONAS.SP</i>	ABREV.		
TICARCILINE	TC		
LEVOFLOXACINE	LEV		
COLESTINE	CT		
TETRACICLINE	TE		

Annexe IV:

Récupération et revivification des souches lactiques :

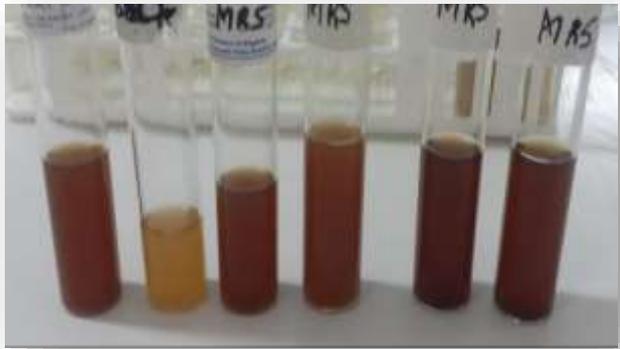


Figure : Revivification des souches *lactobacillus* sur bouillon MRS.



Figure : Revivification des souches *lactococcus* sur bouillon M17.

Annexe V :

1. Les tests biochimiques.

1.1. Galerie Api 10S pour les entérobactéries.

A 	<p>Figure : Illustre les résultats d'identification des souches cibles par la Galerie Api 10S. Ces galeries contiennent des réactifs déshydratés dans des cupules, auxquels on ajoute une suspension du germe à étudier. La galerie est alors incubée pendant une nuit, et les réactions lues. Cette méthode permet de traiter rapidement un grand nombre de souches. Les tests sont, de gauche à droite, ONPG, GLU, ARA, LDC, ODC, CIT, H₂S, URÉE, TDA, INDOLE (la présence d'une nitrate réductase peut être révélée dans la cupule GLU,IND).</p> <p>A. <i>Escherichia coli.</i></p> <p>B. <i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p>C. <i>Enterobacter aerogenes</i></p> <p>D. <i>Salmonella enterica</i></p>
B 	
C 	
D 	

1.2. Galerie Api 20E



Figure : présente les résultats d'identification des souches cibles par la Galerie Api 20 E pour *Pseudomonas aeruginosa*.



Figure : présente les résultats de dégradation des sucres par la Souche lactique Lb1.



Figure : présente les résultats de dégradation des sucres par la Souche lactique Lb2.



Figure : présente les résultats de dégradation des sucres par la Souche lactique Lc2.

1.3.Galerie biochimique classique :



Figure : teste de Mannitol mobilité pour les souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2 .



Figure : teste de Gélose citrate de simmons.



Figure : teste d'ONPG pour les souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2.

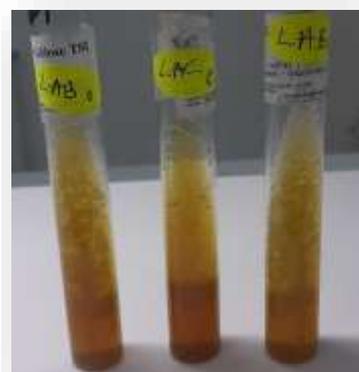


Figure : teste de Gélose TSI. pour les souches lactiques Lb1, Lb2 et Lc2.

Annexe VI :

La purification des souches cibles (SC)

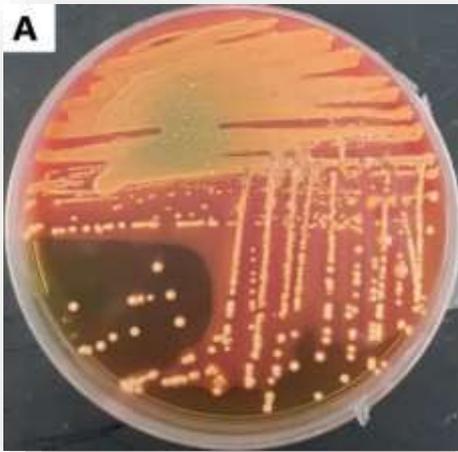


Figure : la purification d'*Escherichia coli* sur milieu Hektoen.

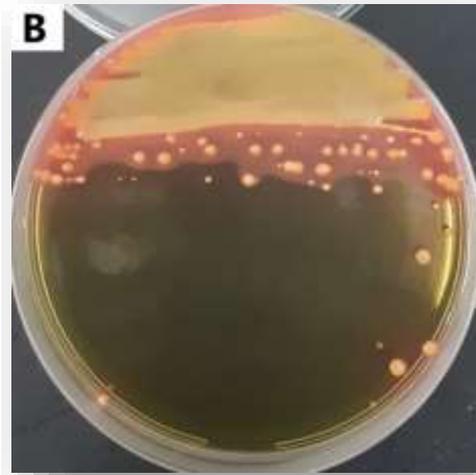


Figure : la purification de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu Hektoen.

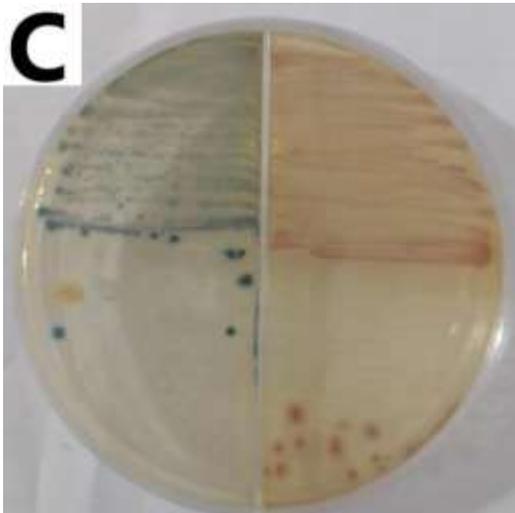


Figure : la purification et confirmation d' *Escherichia coli* (en rose) et *klebsiella pneumoniae* (en bleu Métallique) sur milieu Chromagar.

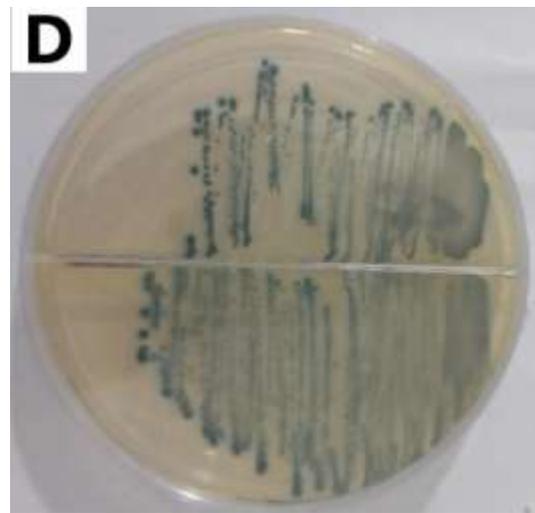


Figure : La purification et la confirmation de *Salmonella enterica* sur milieu chromagar.

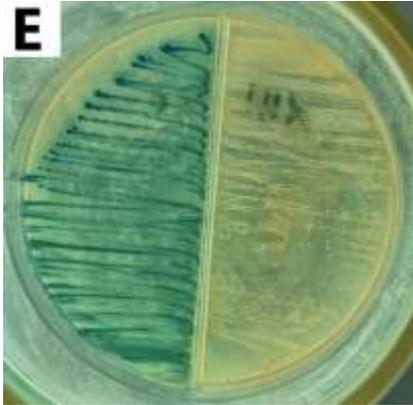


Figure : La purification et la confirmation d'*Enterococcus faecalis* (en bleu turquoise) et *Pseudomonas aeruginosa* (en jaune claire) sur chromagar d'orientation.

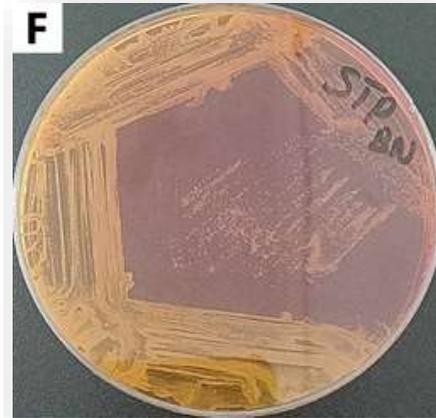


Figure : la purification de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

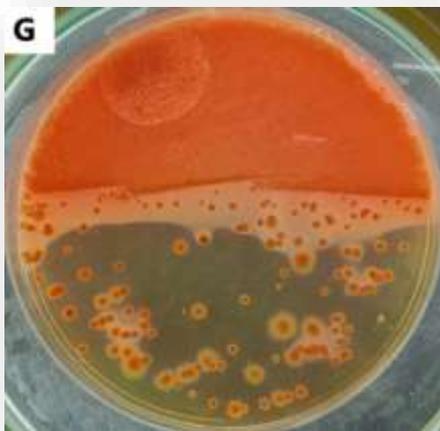


Figure : *Vibrio* sp sur milieu GNAB colonie bleu.

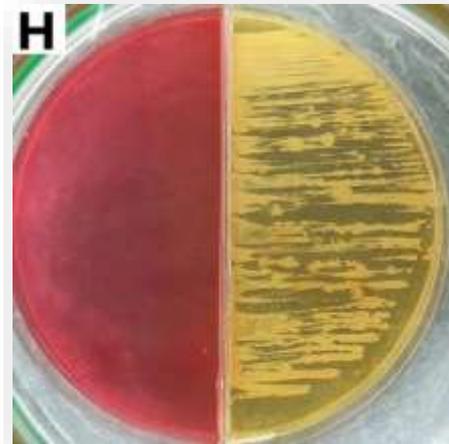


Figure :La purification de *Staphylococcus aureus*, colonies dorées, et *Staphylococcus epidermidis*, colonies blanchâtres, sur milieu Chapman.

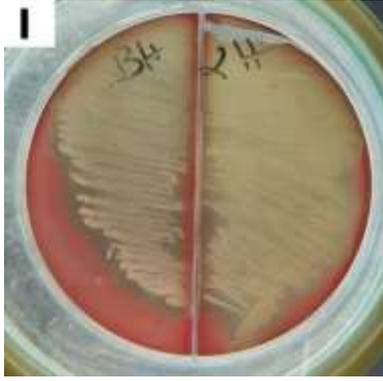


Figure : La purification de *Streptococcus pyogenes* beta-hémolyse sur gélose au sang.

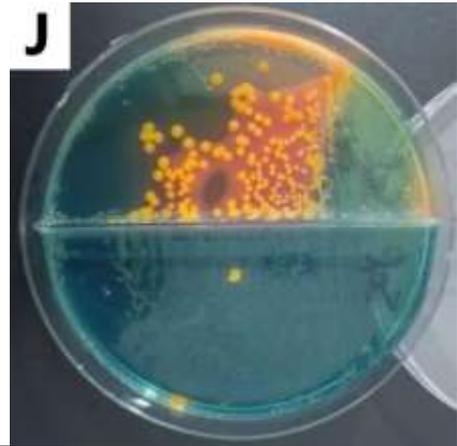
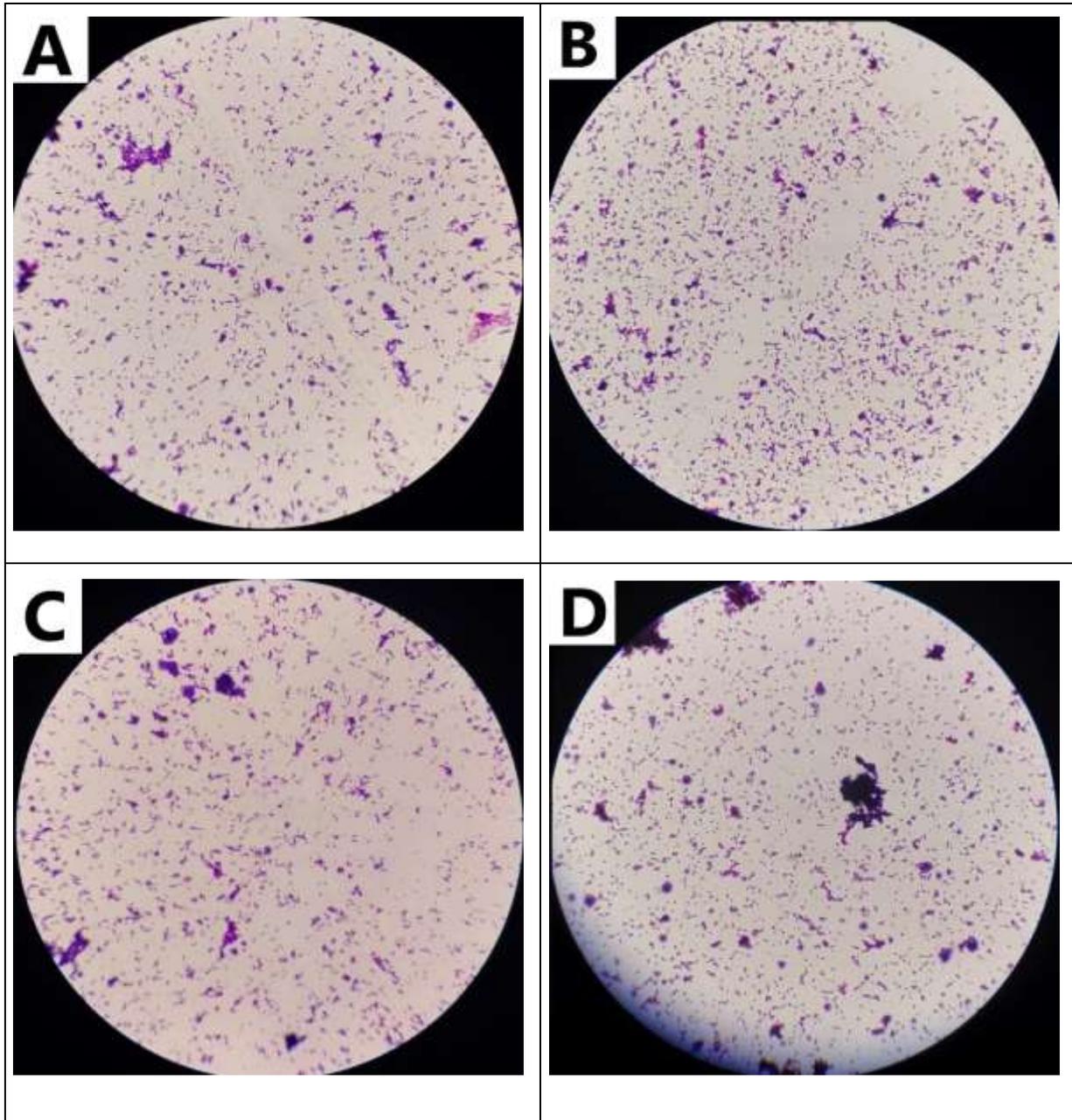


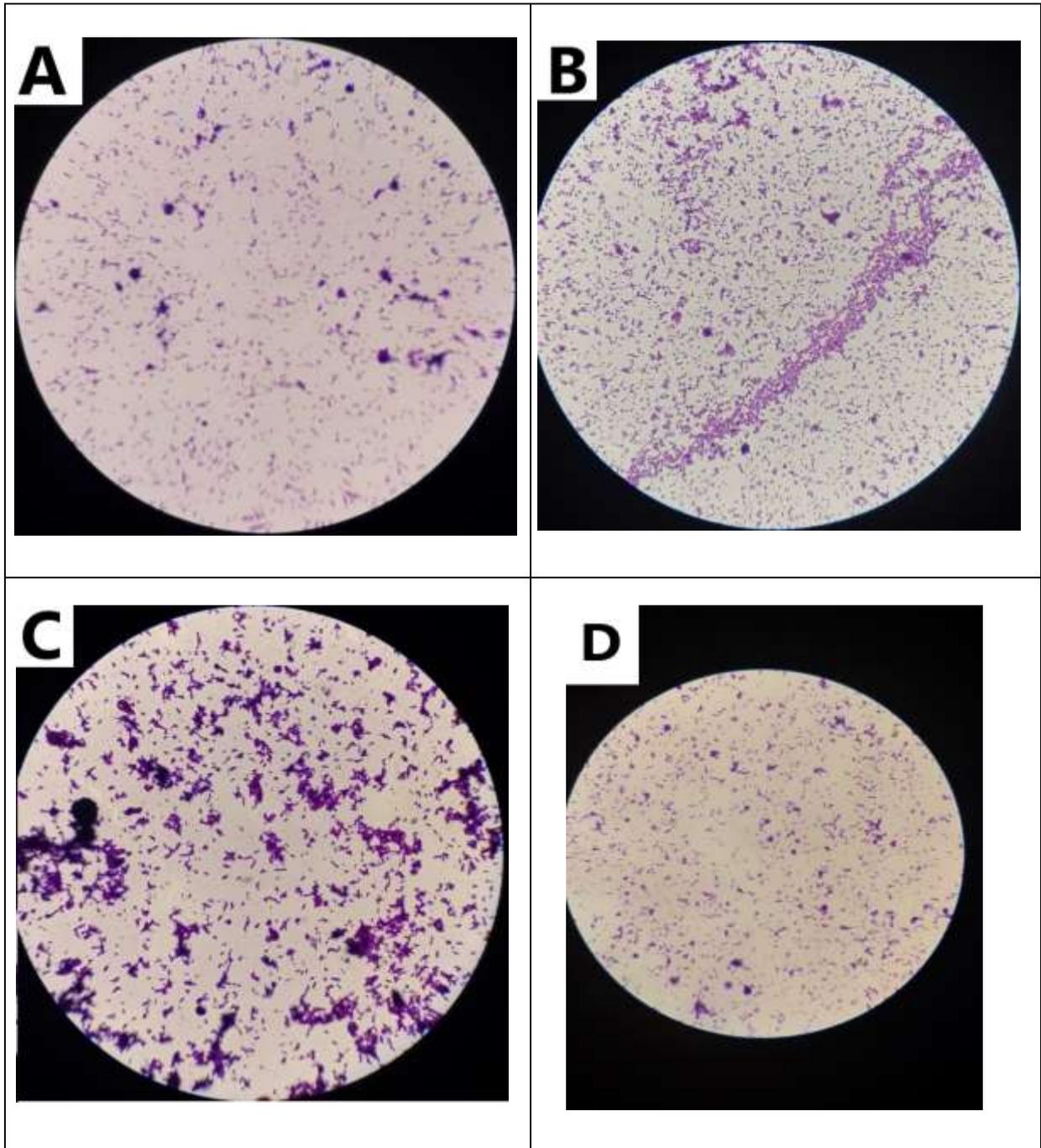
Figure : La purification de *Salmonella enterica* sur milieu Hektoen colonie bleu.

Annexe VII

La coloration de Gram des souches (Lactocoques et Lactobacilles) :



Coloration de Gram Des souches Lb 1(A), Lb 4(B), Lb 7(C) et Lb 8(D).

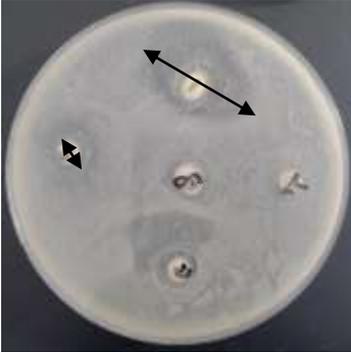
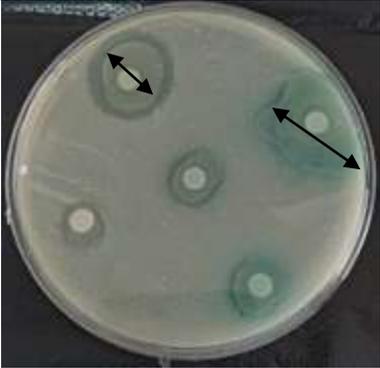


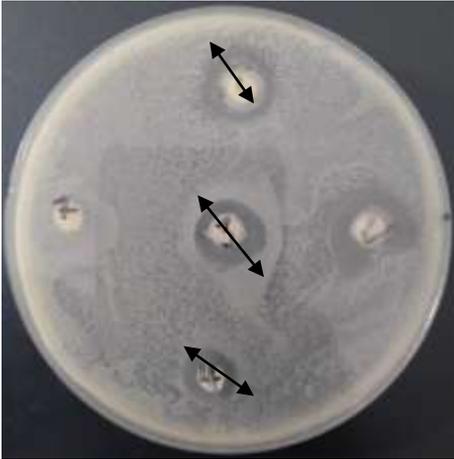
Coloration de Gram Des souches Lc 1(A), Lc 3(B), Lc 4(C) et Lc 5(D).

Annexe VIII

Illustration des résultats d'antagonismes des LAB dirigés contre les SC :

1- Les souches lactobacilles contre les SC à G+ et à G- :

		
<p>Figure : Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre la souche cible <i>Staphylococcus epidermidis</i></p>	<p>Figure: Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre la souche cible <i>Enterococcus faecalis</i></p>	<p>Figure : Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre la souche cible <i>Streptococcus pyogenes</i>.</p>

	
<p>Figure : Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre la souche cible <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p>	<p>Figure : Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre la souche cible <i>Salmonella enterica</i></p>

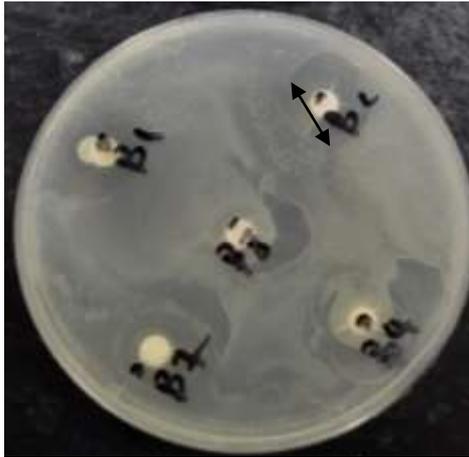


Figure : Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre la souche cible *vibrio* sp

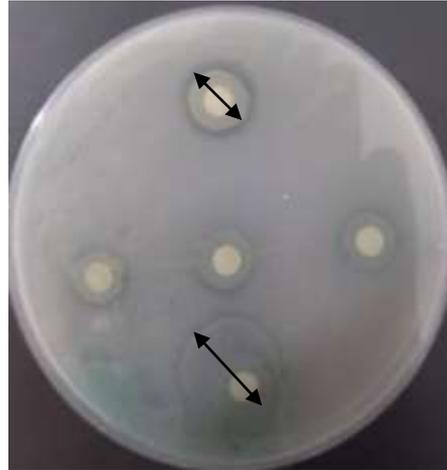


Figure : Interaction des souches Lb1, Lb2, Lb4, Lb7 et Lb8 contre la souche cible *enterobacter aerogenes*

2- Les souches Lactocoques contre les SC à G+ et à G- :

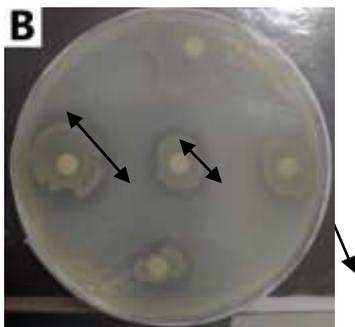


Figure : Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lc5 contre *Streptococcus pyogenes*.

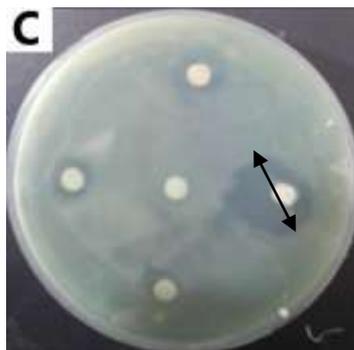


Figure : Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lc5 contre *Staphylococcus pidermidis*

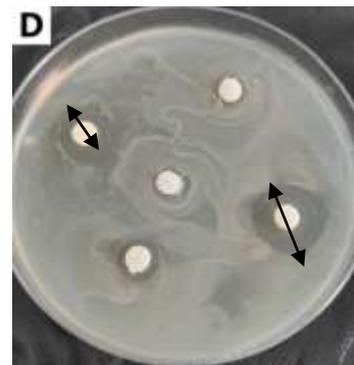


Figure: Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lc5 contre *Enterococcus faecalis*



Figure : Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lc5 contre *Klebsiella pneumoniae*.

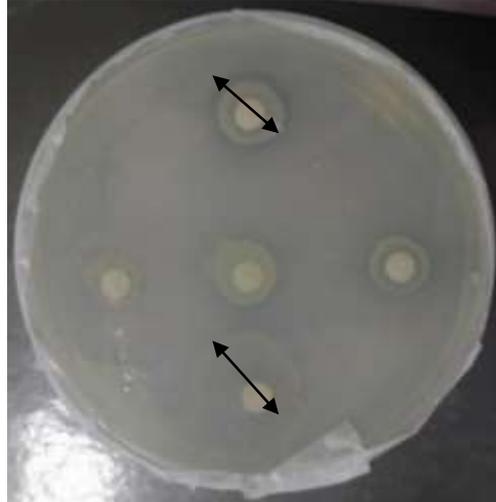


Figure : Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3 Lc4 et Lc5 contre *Vibrio.sp*

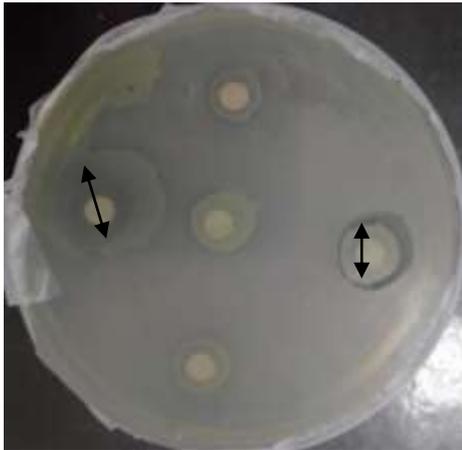


Figure: Interaction des souches Lc1, Lc2, Lc3, Lc4 et Lc5 contre *enterobacter aerogenes*

Annexe IX :

Les résultats des antibiogrammes des souches cibles (SC) et les souches lactiques LAB

a- Antibiogrammes des souches cibles à Gram négatives

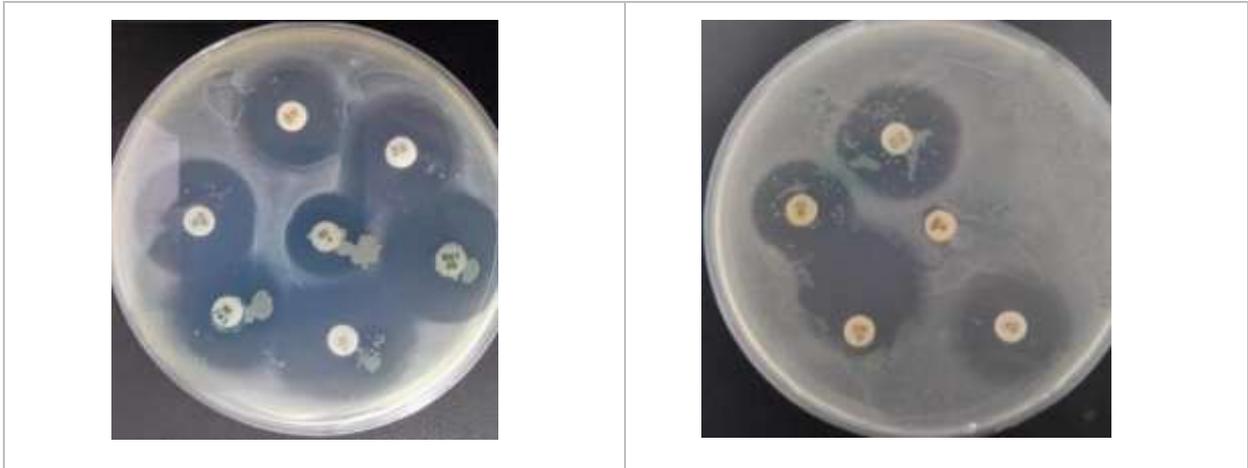


Figure : Antibiogramme d'*Escherichia coli*.

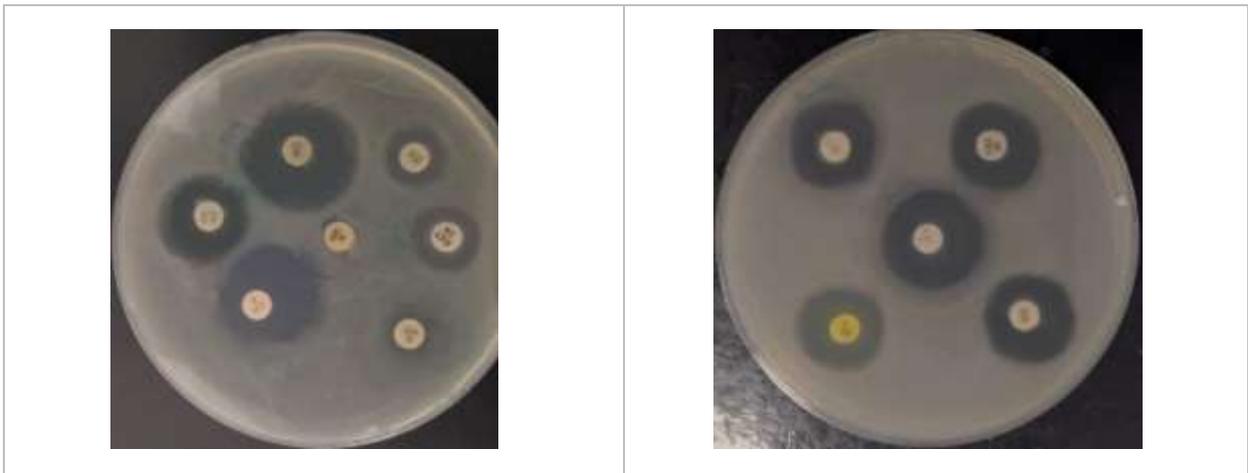


Figure : Antibiogramme d'*Enterobacter aerogenes*.

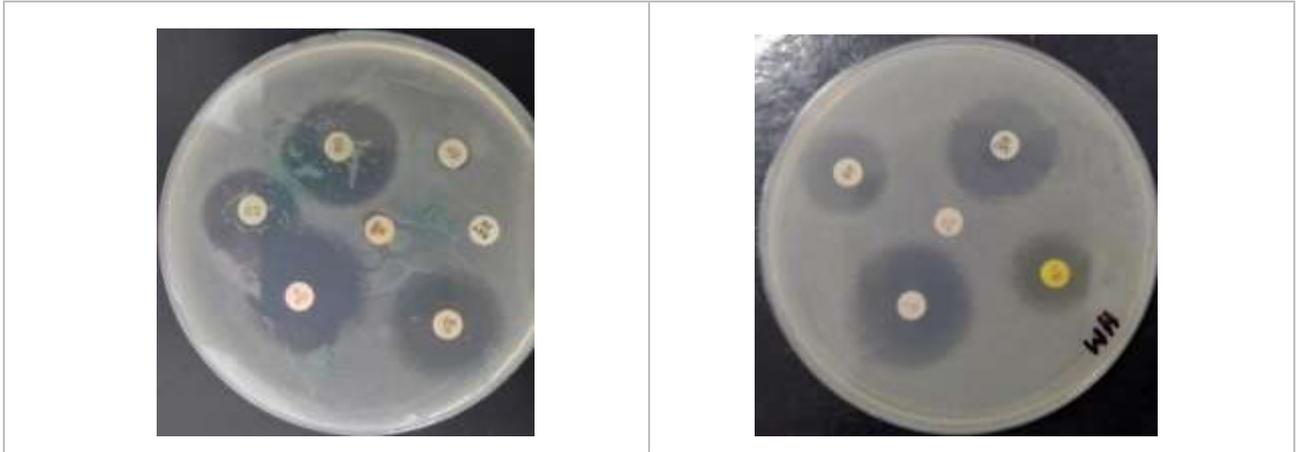


Figure : Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*.



Figure : Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

b- Antibiogrammes des souches cibles à Gram Positive.

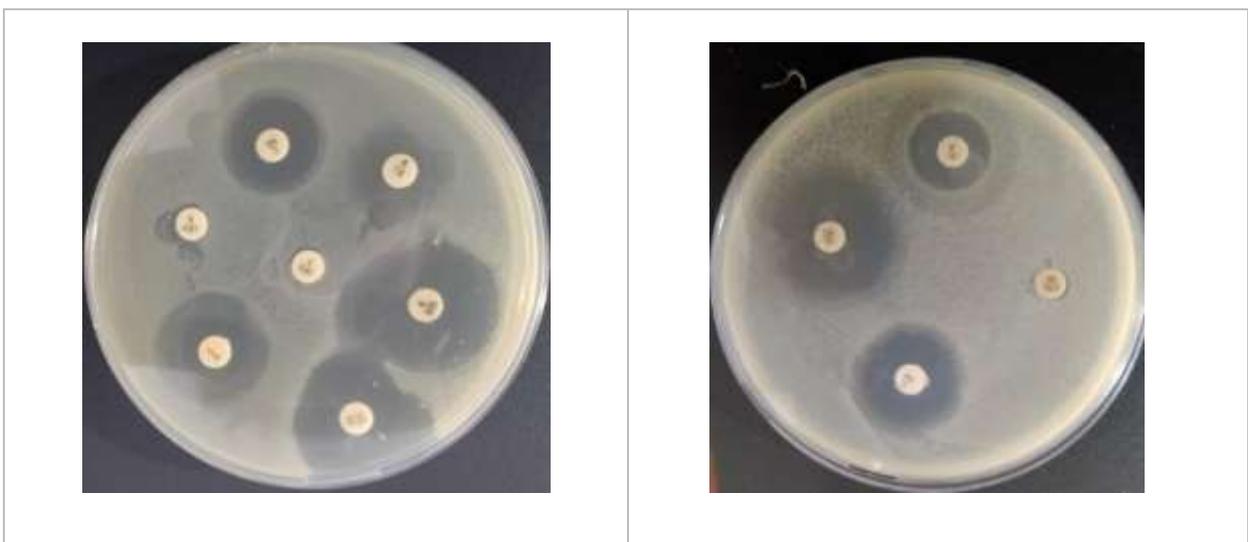


Figure : Antibiogramme de *staphylococcus aureus*.

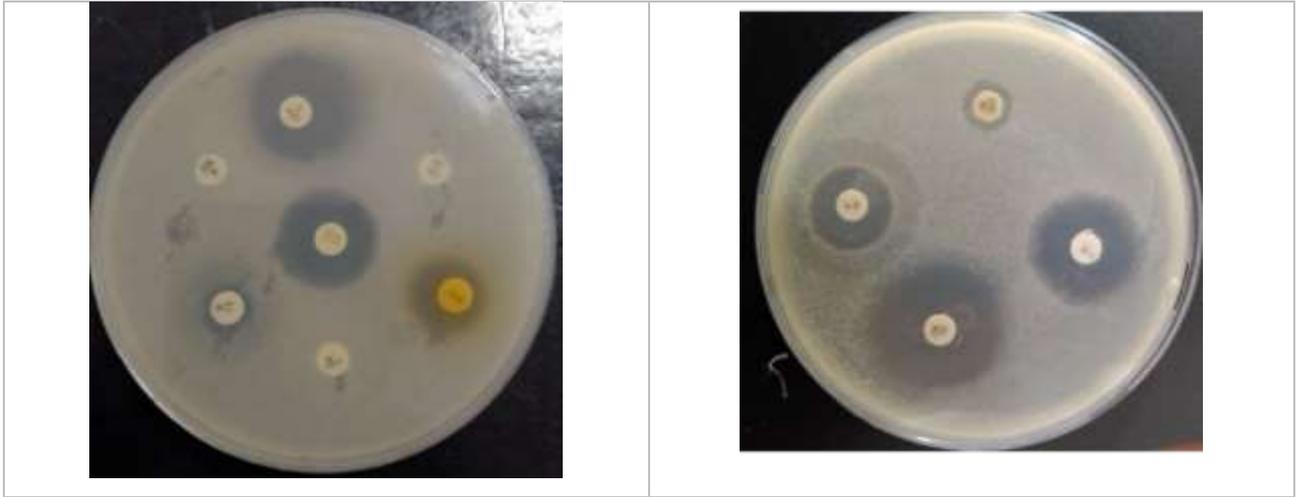


Figure : Antibiogramme de *streptococcus pyogenes*.



Figure : Antibiogramme d'*Enterococcus faecalis*.

c- Antibiogrammes des souches LAB et des souches lactiques de références :

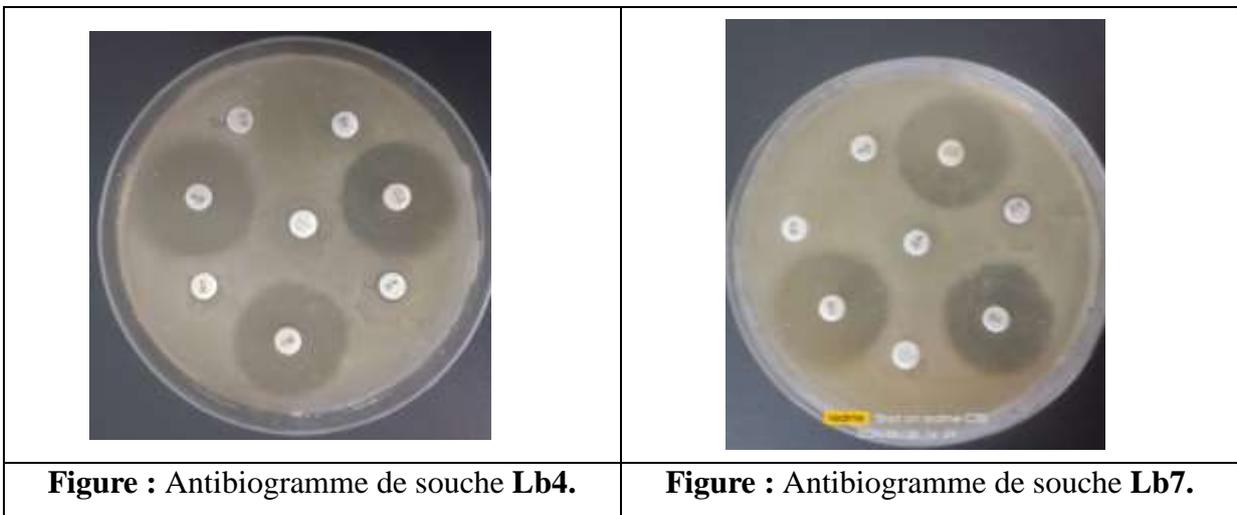




Figure : Antibiogramme de souche **Lc1**.



Figure : Antibiogramme de souche **Lc3**.



Figure : Antibiogramme de souche **Lc5**.



Figure : Antibiogramme de souche de référence des lactobacilles.

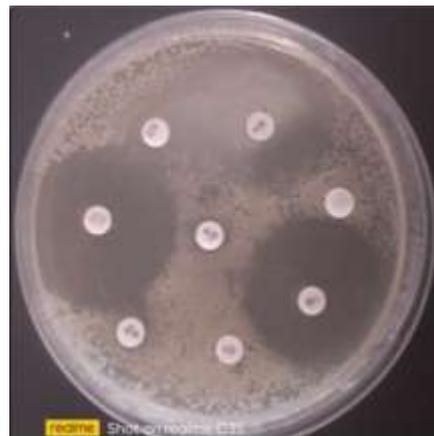


Figure : Antibiogramme de souche de référence des Lactocoques.