



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE **DEL** ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DELA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DEPARTEMENT DE
BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE Présentée par
M^{elle} DJELLOUL-DAOUADJI Soumia

EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Moléculaire et Protéomique

Thème

**Isolement et identification des bactéries
antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes
multirésistantes**

Soutenu le: 

Devant le Jury composé de:

Présidente :

M^{lle} KANOUN Khedoudja

(MCA, Université de Sidi Bel Abbès).

Examineurs :

Mr. MEDDAH Boumediene

(Professeur, Université de Mascara).

Mr. HARIRI Ahmad

(Professeur, Université de Mascara).

Directeur de thèse :

Mr. ABOUNOU Bouziane

(Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Année universitaire 2020/2021

REMERCIEMENTS

J'adresse de sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail

Toute ma gratitude va au Professeur Abbouni Bouziane, mon directeur de thèse pour sa rigueur, son enthousiasme, sa patience et sa présence. J'ai appris beaucoup de chose tout le long de ces années d'étude. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir soutenue et d'être toujours prêt à répondre à mes questions.

Je tiens à remercier profondément la présidente du membre de jury, Mme Kanoun Khedoudja d'avoir présidé ce membre, un grand merci pour vous Madame, pour votre gentillesse et pour votre disponibilité.

Je remercie également le Professeur Mr. Meddah Boumediene et le Professeur Mr. Hariri Ahmad. d'avoir accepté d'examiner ce travail, vos conseils, vos questions et vos remarques seront pertinents pendant la soutenance.

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

*Ceux que personne ne peut compenser les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon
éducation et mon bien être :*

Mes très chers parents

Liste des Abréviations

aa : Acide aminé
ABC:ATP binding Cassette
ADN : acide desoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ATB:Antibiotique
ATCC: American Type Culture Collection
AU/mg : unité arbitraire par milligramme
AU/ml:Unité arbitraire par millilitre.
BHI : Brain heart infusion
BMR:Bactérie multirésistante
CAT : Catalase
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CO₂ : dioxyde de carbone
DO : Densité optique
EPS: Exopolyssaccharide
ERV: Entérocoque Vancomycine Résistant
GC :Guanine-Cytosine
GN :Gélose nutritive
GRAS : Generally reconised as safe
kDa:Kilo Dalton
LAB:Lactic acid bacteria
LB : Luria Bertani
Pb : paire de bases
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : polymerase chain reaction
PEP : Pepsine
PM : Poids moléculaire
rpm : Round per minute
SARM *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline
SDS:Sodium dodécyl sulfate
TRY:Trypsine

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction générale.....	1
Etude bibliographique	
I. La résistance bactérienne aux antibiotiques	4
1. Les antibiotiques	4
1.1. Historique.....	4
2. La résistance aux antibiotiques	5
2.1. Phénotypes de résistance	5
2.2. Types de résistance	5
2.2.1. Résistance naturelle.....	5
2.2.2. Résistance acquise.....	5
3. Bactéries multirésistantes.....	5
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM)	5
3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant	6
3.3. Entérobactéries multirésistantes	6
3.4. Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)	6
3.5. <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
4. Formation de biofilm par les bactéries pathogènes	7
II. Les bactéries Lactiques.....	9
1. Classification et identification	9
2. Voies métaboliques	10
3. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	11
3.1. Acides organiques.....	11
3.2. Peroxyde d'hydrogène	11
3.3. Dioxyde de carbone	11
3.4. Diacétyl.....	11
3.5. Reutéline.....	11
III. Les bactériocines des bactéries lactiques.....	12
1. Définition	12
2. Classification	12
2.1. Bactériocines de la classe I : Lantibiotiques	12
2.2. Bactériocine de classe II	13
2.3. Bactériocines de classe III	13
3. Régulation de la production de bactériocines par le système de« Quorum Sensing »....	13

4. Génétique des bactériocines	13
5. Domaines d'applications des bactériocines.....	16
5.1. Typage bactérien.....	16
5.2. Domaine alimentaire.....	16
5.3. Domaines de la médecine humaine	17
5.4. Domaine vétérinaire.....	17
5.5. Domaine agricole	17
6. La limite de l'utilisation des bactériocines.....	17

Matériel et méthodes

I. Les bactéries lactiques	20
1. Collecte des échantillons	20
2. Isolement des bactéries lactiques	20
2.1. Enrichissement et préparation des dilutions	20
3. Purification.....	20
4. Conservation des souches.....	20
4.1. Conservation à court terme	20
4.2. Conservation à long terme	21
5. Identification primaire du genre	21
5.1. Etude morphologique	21
5.2. Tests biochimiques	21
5.2.1. Recherche de la catalase	21
5.2.2. Type de fermentation	21
6. Identification des espèces	22
6.1. Effet de la température sur la croissance des souches antagonistes.....	22
6.2. Effet du pH sur la croissance des souches antagonistes.....	22
6.3. Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des souches antagonistes	22
6.4. Fermentation des sucres	22
6.5. Hydrolyse de l'arginine.....	23
6.6. Activité protéolytique	23
7. Identification de l'espèce par galerie API 50CHL.....	23
II. Souches pathogènes multirésistantes	24
1. Prélèvement des échantillons	24
2. Isolement et purification des isolats cliniques	24
3. Identification des isolats cliniques	24
3.1. Identification des Staphylocoques	24
3.2. Orientation de l'identification des bactéries pathogènes à Gram négatif	25
4. Antibiotogramme des souches isolées.....	26
5. Détection phénotypique des mécanismes de résistance des souches multirésistantes utilisées	26
5.1. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	26



5.2. Détection phénotypique des mécanismes de résistance des Staphylocoques	28
III. Bactériocines	28
1. Criblage des souches antagonistes	28
1.1. Méthode des spots	28
1.2. Méthode des puits	29
2. Caractérisation de l'agent antagoniste.....	29
2.1. Détermination de la thermorésistance	29
2.2. Détermination du pH optimum	29
2.3. Effets des enzymes protéolytiques.....	30
3. Purification partielle de la bactériocine	30
4. Détection de l'activité bactériocinogène	30
5. Mode d'action de la bactériocine	31
6. Détermination de la concentration de la CMI et de la CMB.....	31
7. Dépistage de la production de biofilm des souches sélectionnées BMR	32
8. Effet inhibiteur des surnageants de culture sur la formation de biofilm	32

Résultats et discussion

I. Infections hospitalières à BMR.....	34
1. Prélèvement	34
2. Isolement et identification des souches hospitalieres	34
2.1. Identification des Staphylocoques et répartition	35
2.1.1. Aspect des colonies	35
2.1.2. Coloration de Gram	35
2.1.3. Test catalase	36
2.1.4. Test coagulase	36
2.1.5. Répartition des souches de <i>Staphylococcus</i>	37
2.2. Identification des entérobactéries et répartition	37
2.2.1. Examen macroscopique et microscopique	37
2.2.2. Identification par des entérobactéries par la galerie biochimique	38
2.2.3. Identification des entérobactéries par galerie API20 ^E	38
2.2.4. Répartition des entérobactéries par genre	39
3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	40
3.1. Sensibilité des souches de Staphylocoques	40
3.1.1. Test de méthicilino-résistance	41
3.1.2. <i>Staphylocoques</i> et Aminosides	42
3.1.3. <i>Staphylocoques</i> et Macrolides	43
3.2. Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux β –lactamines.....	43
3.2.1. Phénotypes de résistance aux β -lactamines	44
3.2.2. Résistance associée	45
II. Bactéries lactiques.....	45
1. Isolement des bactéries lactiques du lait et produits laitiers fermentés traditionnels	46
2. Purification et identification des genres	46

2.1. Aspect macroscopique	46
2.2. Aspect microscopique	47
3. Type fermentaire	48
4. Criblage des souches antagonistes	48
5. Identification des espèces des souches sélectionnées	53
6. Antibiotogramme des souches lactiques	54
7. Caractérisation de l'agent antagoniste.....	56
7.1. Détermination de la thermorésistance.....	56
7.2. Détermination du pH optimum	57
7.3. Effet des enzymes protéolytiques	59
7.4. Etude du suivi de cinétique de croissance des bactéries lactiques et production des bactériocines.	60
8. Purification partielle de la bactériocine.....	63
9. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI	65
10. Mode d'action des bactériocines	66
11. Activité antibiofilm de la bactériocine	68
Conclusion générale et perspectives	72
Références bibliographiques	75

Liste des figures



Figure 1: Illustration de différents mécanismes impliqués dans la résistance de biofilms	8
Figure 2: Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i>	10
Figure 3: Représentation schématisée de principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques	10
Figure 4: Arrangement schématisée des gènes codant la production de bactériocine de classe II par rapport aux gènes de production de nisine	15
Figure 5: Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.	27
Figure 6: Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.	27
Figure 7: Mise en évidence de la détection des SARM	28
Figure 8: Répartition des isolats cliniques selon la coloration de Gram.	34
Figure 9 : Aspect des colonies de <i>staphylococcus</i> sur milieu de culture de Chapman.	35
Figure 10: Coloration de Gram et observations microscopiques des souches de <i>Staphylocoques</i> grossissement x100.	35
Figure 11 : La mise en évidence de la production du catalase chez les cocci à Gram positif.	36
Figure 12 : La mise en évidence de la présence coagulase chez <i>Staphylococcus sp</i>	36
Figure 13 : Répartition des souches de <i>Staphylococcus</i> selon la coagulase.	37
Figure 14 : Aspect macroscopique des entérobactéries ensemencées sur milieu de culture Mac Conkey et Hektoen.	37
Figure 15: Coloration de Gram et l'Observation microscopique (Grossissement X 100) des souches isolées d' <i>E.coli</i> .	38
Figure 16 : La mise en évidence de la galerie biochimique classique	38
Figure 17 : Aspect des galeries API 20E des souches <i>Escherichia coli</i> (5142500), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (5315773) et <i>Proteus mirabilis</i> (0726002)	39
Figure 18 : Répartition des souches d'entérobactéries selon le genre	39
Figure 19 : Taux de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative.	40
Figure 20 : Antibiogramme de <i>staphylococcus aureus</i> (Staph. 63), isolée à partir de sécrétion pulmonaire.	40
Figure 21 : Antibiogramme de <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative (Staph. 01), isolée à partir de sécrétion pulmonaire.	41

Figure 22 : Détection de la méticillino-résistance de <i>S.aureus</i> (Staph.107), isolée à partir de d'un cathéter veineux périphérique	41
Figure 23: Taux de résistance et de sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> à la méthicilline ⁴²	
Figure 24 : Taux de résistance des souches aux β -lactamines.	44
Figure 25 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines.	44
Figure 26: Détermination de phénotype CASE et (CASE+ BLSE)	45
Figure 27: Détermination de phénotype BLSE et (PASE).....	45
Figure 28: Aspect lenticulaires de couleur blanche des colonies des bactéries lactiques, isolées sur milieu de culture MRS.	47
Figure 29: Aspect microaérophiles des cultures pures des bactéries lactiques, isolées sur milieu de culture MRS liquide.....	47
Figure 30: La coloration de Gram et l'observation microscopique des bactéries actiques, isolées, sélectionnées LAB20 (A), LAB16 (B) et LAB50 (C).	48
Figure 31: Illustration du type fermentaire d'une souche isolée sur milieu de culture de MRS glucosé, <i>Lactobacillus sp</i> et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> sont des souches témoins utilisées	48
Figure 32 : L'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées vis-à-vis de bactéries pathogènes de <i>S.typhi</i> ATCC14028 (A) et <i>S. aureus</i> MRSA9 (B) par méthode de diffusion sur gélose, inoculées sur le milieu de culture solide MRS, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures.	49
Figure 33 : Profil fermentaire de la souche LAB 13, identifiée par lagalerie API 50 CHL.	54
Figure 34 : AntibioGramme de la souche LAB9 et LAB13.	55
Figure35: Effet du traitement thermique de la bactériocine, chez la souche isolée, sélectionnée LAB13.....	56
Figure 36 : L'étude du suivi de la cinétique de croissance de LAB9 et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B), incubée à une température de 37°C.....	62
Figure 37: Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées <i>Lactococcus raffinolactis</i> (A14), <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i> (A86) vis-à-vis de germes pathogènes	63
Figure 38: L'étude du suivi de la cinétique de croissance de <i>P. aeruginosa</i> (PA) en présence et en l'absence de surnageant de LAB 9, inoculée dans le milieu de	

culture liquide MRS, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures ... 67

Figure 39: L'étude du suivi de la cinétique de croissance de *P. aeruginosa* (PA) en présence et en l'absence de surnageant de LAB 13, inoculée dans le milieu de culture liquide MRS, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures. ..67

Figure 40: Activité inhibitrice du surnageant LAB9 et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilm auprès bactéries pathogènes. 69

Figure 41 : Activité inhibitrice du surnageant LAB9 et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilm de *S.aureus* par la méthode TCP 70

Figure 42 : Activité inhibitrice du surnageant LAB9et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilm de *S.aureus* par la méthode TM..... 70

Liste des tableaux

Tableau 1: Nombre de prélèvements effectués dans le service de réanimation.	34
Tableau 2: Détermination de phénotype de résistance aux aminosides.....	43
Tableau 3: Détermination de phénotype de résistance aux macrolides.	43
Tableau 4: Résistance des entérobactéries en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	46
Tableau 5: Illustration de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques antagonistes isolées vis-à-vis de souches pathogènes <i>E.coli</i> ATCC 25992 , <i>S. typhi</i> ATCC 14028, KP7, PA, AB3, MRSA9, SP421, EF 32.....	50
Tableau 6: Présentation des caractéristiques biochimiques des souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB 9 et LAB13) lors de l'utilisation de la galerie API CHL50.....	53
Tableau 7: L'antibiogramme des souches lactiques isolées, sélectionnées, antagonistes (LAB 9 et LAB13).	54
Tableau 8: L'effet du pH sur l'activité productrice de la bactériocine chez la souche isolée sélectionnée antagoniste LAB13.....	58
Tableau 9: L'effet du traitement enzymatique des souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB 9 et LAB13).....	59
Tableau 10: Précipitation de bactériocines produites chez les bactéries lactiques isolées, sélectionnées, antagonistes (LAB 9 et LAB13) avec le sulfate d'ammonium et dialyse.	64
Tableau 11: Détermination de la CMI et CMB du surnageant de la souche LAB9.	65
Tableau 12: Détermination de la CMI et CMB du surnageant de la souche LAB13.	65

RESUME

L'émergence sans cesse croissante de bactéries résistantes face à l'appauvrissement des ressources thérapeutiques et à l'absence d'avancée dans le domaine des antibiotiques, mettent en avant l'importance de trouver de nouvelles solutions.

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires un moyen de bio conservation efficace de nombreux produits alimentaires.

Les 200 bactéries lactiques isolées à partir du lait (chamelle et chèvre) et des produits laitiers fermentés traditionnels (Jben et kamaria) du sud Algérien: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont identifiées phénotypiquement.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne vis-à-vis de souches pathogènes multirésistantes, isolées à partir de patients atteints d'infections au service de réanimation est évaluée et les souches résistantes aux antibiotiques sont retenues.

Ensuite, les souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes *Lactococcus raffinolactis* LAB9 et *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*cremoris* LAB13 sont utilisées pour une éventuelle caractérisation de bactériocines.

La caractérisation physico-chimique de bactériocines produites chez les souches isolées, sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) a révélé leur thermo-résistance, accompagnée d'une activité inhibitrice stable à différentes valeurs de pH.

Ensuite, une purification partielle de bactériocine par précipitation avec le sulfate d'ammonium est réalisée et la concentration minimale inhibitrice est déterminée. L'activité antibiofilm souches LAB9 et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est effectuée.

L'étude du suivi de la cinétique de croissance a montré une inhibition considérable de la croissance *P. aeruginosa* (PA), après l'ajout d'un volume de 1 ml des surnageants des bactéries lactiques isolées, sélectionnées (LAB9 et LAB13). Cette inhibition est expliquée par l'arrêt du cycle cellulaire de *P. aeruginosa* PA (une croissance déséquilibrée), en comparaison avec la biomasse non traitée (croissance équilibrée).

En conclusion, les résultats obtenus ont montré la nécessité d'approfondir les recherches sur la purification des bactériocines par l'utilisation des techniques modernes telles que HPLC, FPLC, électrophorèse et leur clonage dans des vecteurs d'expressions puissants.

Mots clés: Produits laitiers, bactéries lactiques, bactéries pathogènes, multirésistance, Bactériocine, CMI, CMB, Biofilm.

ABSTRACT

The ever-increasing emergence of bacteria resistant to the depletion of therapeutic resources and the lack of progress in the field of antibiotics, highlights the importance of finding new solutions.

Lactic acid bacteria have been an effective means of bio-preservation for many food products for thousands of years.

The 200 lactic acid bacteria isolated from milk (camel and goat) and traditional fermented dairy products (Jben and kamaria) from southern Algeria *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* are phenotypically identified.

The demonstration of the antibacterial activity vis-à-vis multiresistant pathogenic strains isolated from patients with infections in the intensive care unit is evaluated and the antibiotic resistant strains are selected.

Then, the isolated lactic strains, selected antagonists *Lactococcus raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp.cremoris LAB13 are used for a possible characterization of bacteriocins.

The physicochemical characterization of bacteriocins produced in isolated strains, selected antagonists (LAB9 and LAB13) revealed their thermo-resistance, accompanied with a stable inhibitory activity at different pH values.

Then, partial purification of bacteriocin by precipitation with ammonium sulfate is carried out and the minimum inhibitory concentration is determined. The antibiofilm activity of the LAB9 and LAB13 strains against the formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is carried out.

The study of the monitoring of the growth kinetics showed a considerable inhibition of the growth of *P. aeruginosa* (PA), after the addition of a volume of 1 ml of the supernatants of the isolated, selected lactic bacteria (LAB9 and LAB13). This inhibition is explained by the cell cycle arrest of *P. aeruginosa* PA (unbalanced growth), in comparison with untreated biomass (balanced growth).

In conclusion, the results obtained showed the need for further research on the purification of bacteriocins by the use of modern techniques such as HPLC, FPLC, electrophoresis and their cloning into powerful expression vectors.

Keywords: Dairy products, lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, multidrug resistance, Bacteriocin, CMI, CMB, Biofilm.

الملخص

إن التزايد الظاهر باستمرار، للبكتيريا المقاومة لاستنفاد الموارد العلاجية، وفي غياب أي تقدم محرز في مجال المضادات الحيوية، يبرزان مدى أهمية ضرورة إيجاد حلول جديدة. تشكل بكتيريا حمض اللبنيك وسيلة فعالة للحفاظ الحيوي للعديد من المنتجات الغذائية، وذلك منذ آلاف السنين.

لقد تم التعرف ظاهرياً على 200 بكتيريا حمض اللبنيك المعزولة من الحليب (الإبل والماعز) ومنتجات الألبان المخمرة تقليدياً (الجبن والقمرية) من جنوب الجزائر، ومن جملة هذه البكتيريا المعزول نجد المكورات المعوية (انتروكوكس)، والمكورات العقدية واللاكتوكوكوسوالليكونوستوك. ويُقِيم عرض النشاط المضاد للبكتيريا ضد السلالات المسببة للأمراض متعددة المقاومة، المعزولة من المرضى المصابين بالعدوى بوحدة العناية المركزة، ثم تُختار السلالات المقاومة للمضادات الحيوية.

بعد ذلك، تُستخدم سلالات *البنيك (اللاكتيك) المعزولة، والمضادات المختارة، Lactococcus raffinolactis* LAB9 وLAB13 *Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris* لتوصيف محتمل للبكتريوسينات. وقد أظهر التوصيف الفيزيائي الكيميائي للبكتريوسينات المنتجة في السلالات المعزولة، المضادات المختارة (LAB9 وLAB13)، مقاومتها الحرارية، مصحوبة بنشاط كايح مستقر عند قيم pH مختلفة. بعد ذلك، تُجرى تنقية جزئية للبكتريوسين عن طريق الترسيب باستعمال مركب كبريتات الأمونيوم ويتم تحديد أدنى تركيز كايح (CMI). وبذلك ينفذ النشاط المضاد للأغشية الحيوية لسلالات LAB9 وLAB13 ضد تكوين الأغشية الحيوية للمكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية.

أظهرت دراسة مراقبة حركية النمو، قدراً معتبراً من الكبح لنمو الزائفة الزنجارية (PA)، بعد إضافة مقدار 1 مل من المواد الطافية لبكتيريا اللاكتيك المعزولة والمختارة (LAB9 وLAB13). ويمكن تفسير هذا الكبح، بتوقف دورة الخلية للزائفة الزنجارية (PA)، (نمو غير متوازن)، مقارنةً بالكتلة الحيوية غير المعالجة (النمو المتوازن).

في الختام، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها، الحاجة إلى مزيد من البحث حول تنقية البكتريوسينات باستخدام التقنيات الحديثة مثل HPLC وFPLC والرحلان الكهربائي واستنساخها في نواقل تعبير قوية.

مصطلحات أساسية: منتجات الألبان، بكتيريا حمض اللاكتيك، البكتيريا المسببة للأمراض، مقاومة الأدوية المتعددة، البكتريوسين، أدنى تركيز كايح CMI، CMB، الأغشية الحيوية

Introduction générale

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques est dans le monde entier un problème grave de santé publique. Elle augmente de façon exponentielle pour certaines bactéries et dans certains pays. Elle menace la qualité et la sécurité des soins **(Roca et al., 2015)**. A l'hôpital, la prescription à grande échelle, et parfois inappropriée d'antibiotiques fait que les bactéries évoluent constamment vers la résistance, Le lien entre la consommation d'antibiotiques et l'émergence de résistance a bien été établi, notamment pour certains couples (germe-antibiotique) **(Garrouste-Orgeas et al., 2008)**.

La dissémination des bactéries résistantes est à l'origine d'une augmentation considérable de la mortalité, de la morbidité ainsi que du coût des traitements **(Monaco et al., 2013)**. Parmi les germes responsables d'infections bactériennes, les entérobactéries sont les plus redoutables car elles sont productrices de bêta-lactamases et possèdent d'autres mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques **(Carattoli, 2009)**. *Staphylococcus aureus* est un pathogène dont le fort pouvoir d'adaptation permet leur survie grâce à l'acquisition successive de gènes de résistance aux antibiotiques, de mécanismes de régulation de la croissance en présence d'antibiotiques et de facteurs de virulence particuliers **(Dumitrescu et al., 2010)**.

La multirésistance bactérienne aux antibiotiques est l'image la plus grave de la résistance car elle réduit notablement les possibilités thérapeutiques et se traduit par une augmentation considérable de la morbidité et parfois de la mortalité, ainsi que des coûts d'hospitalisation **(Cosgrove et al., 2003)**.

Les bactéries multirésistantes (BMR) responsables d'infections nosocomiales en réanimation sont: entérobactéries productrices de bêta- lactamase à spectre étendu (EBLSE), *Acinetobacter baumannii* multirésistant (ABR) et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (PAR), et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) **(Khiev et Veber , 2010)**.

Les bactériocines des bactéries lactiques (LAB) sont des peptides ou protéines antimicrobiennes synthétisés par le ribosome qui possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de large éventail de bactéries pathogènes **(De Vuyst et Leroy, 2007)**.

Les bactériocines sont des métabolites secondaires produites durant la phase stationnaire de croissance bactérienne. De nombreuses bactériocines produites par un large éventail de bactéries sont classées en fonction de leur mode d'action, leur spectre d'activité et leur masses moléculaires **(Klaenhammer,1993)**.

Les bactériocines sont des agents antimicrobiens naturels et font partie de l'alimentation

humaine et constituées un excellent substrat pour le traitement des infections chroniques et multirésistantes et forment des agents antibactériens très spécifiques car elles tuent les bactéries étroitement liées aux souches productrices et entrent en compétition avec des bactéries proches (Cleveland *et al.*, 2001 ; Majeed *et al.*, 2011). Cette spécificité extraordinaire des bactériocines en fait des agents thérapeutiques très attractifs contre les infections chroniques (Cotter *et al.*, 2013) .

Les propriétés inhérentes telles que la faible toxicité, la puissance, la disponibilité de peptides à spectre large et étroit de bactériocines impliquent une alternative viable aux antibiotiques (Cotter *et al.*, 2013)

Des études antérieures sur des lantibiotiques tels que la nisine, la lacticine appartenant à la bactériocine de classe I, ont montré une importante activité vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae*, Les *Staphylocoques*, y compris le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), les Entérocoques résistants à la vancomycine (Piper *et al.*, 2009).

Des travaux antérieurs réalisés par (Benmechernene *et al.*, 2013; Zarour *et al.*, 2018 ; Mokdad *et al.*, 2020) ont porté sur l'identification des bactéries lactiques (LAB) indigènes isolées à partir de lait de chamelle cru ont induit un effet inhibiteur supplémentaire contre les bactéries pathogènes.

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

- ✓ Isolement et Identification des isolats lactiques.
- ✓ Etat des lieux des infections acquises en milieu hospitalier, et isolement des bactéries pathogènes multirésistantes.
- ✓ Effet antimicrobien des isolats lactiques et Screening pour la production de bactériocines.
- ✓ Caractérisation de bactériocines.
- ✓ Activité inhibitrice de bactériocine vis-à-vis de la formation de biofilm.
- ✓ L'utilisation de souches productrices de bactériocines dans l'inhibition de la formation un biofilm sur cathéter veineux contaminé par des souches bactériennes multirésistantes.

1. Etude bibliographique

I. La résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Les antibiotiques

1.1. Historique

La découverte des antibiotiques constitue un événement majeur dans l'histoire de la médecine (**Almi et al.,2006**), notamment la pénicilline en 1928 a sans doute été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle. L'utilisation antibiotiques depuis les années 1940 a considérablement réduit le taux de morbidité et de mortalité lié aux maladies infectieuses (**Van et al., 2011**).

En 1876, Tyndall a constaté que des cultures renfermant plusieurs espèces microbiennes évoluent en se simplifiant : certaines espèces disparaissent, Un champignon se développe souvent : c'est un pénicillium. La même observation est faite l'année suivante par Pasteur qui écrit : "Ces phénomènes d'antagonisme autorisent peut-être les plus grands espoirs au point de vue thérapeutique." (**Klein, 2014**). Le terme antibiose a été créé en **1889** par **Vuillemin** pour désigner les phénomènes d'antagonismes entre organismes vivants par opposition à symbiose. En 1929, Fleming remarque que les *Staphylocoques* ensemencés sur une boîte de Petri disparaissent sous l'action d'une moisissure, *Penicillium notatum*. Il le cultive et a constaté que le filtrat de culture est antagoniste de nombreuses espèces bactériennes surtout Gram⁺. all donne le nom de "pénicilline" à cette substance antibiotique. En effet, la molécule de pénicilline est fragile et Fleming aurait dû collaborer avec des biochimistes, spécialistes de l'extraction (**Ndeli, 2009**). En 1929, Dubos, a étudié la microflore du sol et a fait une constatation intéressante : le sol comporte peu de germes pathogènes qu'on y déverse pourtant en quantité. Dubos a montré la présence dans le sol de microorganismes producteurs d'antibiotiques comme la Tyrothricine, isolée du *Bacillus brevis* (**Klein, 2014**).En **1942**, **Waksman** a développé l'usage de nom antibiotique, l'antibiose étant un cas particulier de l'antagonisme : effet produit par voie chimique par l'intermédiaire de substances antibiotiques (**Ndeli, 2009**).

Il existe sept classes majeures d'antibiotiques bactériens utilisés en milieu clinique :

Les β -lactamines, les glycolipides, les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les quinolones et les sulfamides (**Nukaga et al.,2003**).

2. La résistance aux antibiotiques

2.1. Phénotypes de résistance

La lecture de l'antibiogramme a permis d'obtenir l'expression phénotypique, c'est-à-dire la détermination de la sensibilité de la souche vis-à-vis d'un nombre déterminé d'antibiotique (El abdani, 2016). La souche exprimant une résistance naturelle appartient au phénotype "sauvage" ou sensible. L'expression de la souche d'un phénotype acquis de résistance identifiable, la détermination leur mécanisme est nécessaire (Lagha, 2015).

Les phénotypes sont souvent désignés par les initiales des antibiotiques devenus inactifs : ainsi une souche résistante à la kanamycine, à la tobramycine et à la gentamicine appartient au phénotype KTG (El abdani, 2016).

2.2. Types de résistance

La résistance bactérienne aux ATB est l'un des problèmes de santé publique mondiaux les plus graves. De nombreux germes responsables de maladies infectieuses se manifestent résistants aux antibiotiques. Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance naturelle (intrinsèque) et la résistance acquise.

2.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (CA-SFM, 2018). Elle est permanente et d'origine Chromosomique, stable et transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais généralement non transférable d'une bactérie à l'autre (transmission Horizontale) (Carle, 2009).

2.2.2. Résistance acquise

La Résistance acquise est utilisée pour la désignation de processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques (Chopra et al., 2003). Elle est souvent moins stable, se propage de façon importante dans le monde bactérien, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique. Le nouveau gène introduit peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif ou de transposons (Yala et al., 2001).

3. Bactéries multirésistantes

3.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)

Les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline sont des cocci à Gram positif appartenant à la famille des Staphylococcaceae, habituellement rassemblés en grappe, avec une catalase positive et coagulase positive (Chevrolet et al., 1997).

Les SARM représentent (5-10 %) des bactéries isolées à partir des infections nosocomiales, sont résistantes à toutes les beta-lactamines et souvent résistantes aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones (**Vincent, 2000**).

Elles représentent une menace dans les services de soins intensifs et de réanimation, chez les patients à haut risque infectieux, nécessitant des hospitalisations prolongées et de nombreuses procédures invasives et également les patients sont soumis à une forte pression d'antibiotique (**Quinacampoix et Mainardi , 2001**).

Le rapport 2015 de réseau algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques publie une proportion de SARM au sein du service de réanimation de 38,65%(**Ras, 2015**).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant

Les souches de *P.aeruginosa* résistantes aux β -lactamines (ticarcilline, ceftazidime ou imipénème) ont tendance à être résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones (**Tankouic, 2000**). Bacille à Gram négatif, aérobie stricte à métabolisme oxydatif, non sporulé, en forme de bâtonnet (**Floret et al., 2009**). Cette espèce est caractérisée par une aptitude particulière à l'acquisition et l'accumulation de nombreux mécanismes de résistance, devenue une problématique car elle conduit à une impasse thérapeutique en raison de l'émergence des souches dites totorésistantes vis-à-vis du panel d'antibiotiques actuellement disponibles (**Minchella, 2010**).

3.3. Entérobactéries multirésistantes

Les Entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif regroupent de nombreux genres telles que *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* (**Vincent, 2000**).

Certaines entérobactéries sont pathogènes strictes (ex : *Salmonella typhi* ou *Shigella dysenteria*). D'autres sont, responsables d'infections opportunistes chez des patients souvent fragilisés. La résistance aux bêta-lactamines est principalement due à la production de bêtalactamases à spectre étendu (BLSE), enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines ou céphalosporines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes (**Doublet, 2012**).

3.4. Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)

les Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) représentent environ 1% des souches d'entérocoques isolées des hopitaux, normalement présentes dans les voies urinaires et les intestins humains, dépourvus des facteurs spécifiques de pathogénécité et souvent

considérés comme germes de la flore commensale (Vincent, 2000 ; Ronald et Jones , 2001).

Ces germes présentent une résistance naturelle vis-à-vis de de nombreuses classes d'ATB, parmi lesquelles les bêta-lactamines, une résistance naturelle faible aux aminosides due à une anomalie de transport membranaire de ces antibiotiques.

En 2015, le réseau algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques a signalé une proportion de 8,69% d'*Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine (RSA, 2015).

3.5. *Acinetobacter baumannii*

Le genre *Acinetobacter* représente aujourd'hui un modèle d'adaptation particulièrement efficace en termes d'antibiorésistance en l'espace de 40 ans. *Acinetobacter* principalement représenté par l'espèce *baumannii* est un bacille à gram négatif, présentant souvent une multi résistance aux antibiotiques (Zahar et al., 2012).

Cette bactérie naturellement résistante à plusieurs bêta-lactamines est considérée comme pathogène opportuniste occasionnellement responsable d'infection nosocomiale. *Acinetobacter baumannii* représente (2-4%) de bactéries responsables d'infections nosocomiales (Poirel et Nordmann, 2006). Les infections souvent rencontrées sont des infections pulmonaire en particulier chez les patients intubés et ventilés en réanimation, les septicémies, les infection de plaie et les infections du tractus urinaire (Patwardhan et al., 2008). *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème a présenté une proportion de (82,79%) dans le service de réanimation selon les données de réseau algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques (RSA, 2015).

4. Formation de biofilm par les bactéries pathogènes

Les bactéries peuvent s'unir et s'organiser dans une matrice extracellulaire et formant une fine couche appelée « biofilm ». Les biofilms se forment sur le matériel inerte (prothèse sur un patient, ou environnement hospitalier, facilitant la contamination). Les bactéries constituent (5-35%) du volume du biofilm. Cette aptitude de bactéries à former un biofilm augmente considérablement le phénomène d'antibiorésistance et causent des infections chroniques avec des rechutes. La diversité d'infections à biofilm représentent au moins (65%) des infections bactériennes (Rhoads et al., 2008).

De nombreuses hypothèses pouvant expliquer l'antibiorésistance des bactéries organisées en biofilms. Les molécules d'antibiotiques peuvent pénétrer insuffisamment dans le biofilm et les cellules des couches externes du biofilm subissent des dommages sans l'atteinte des couches sous-jacentes.

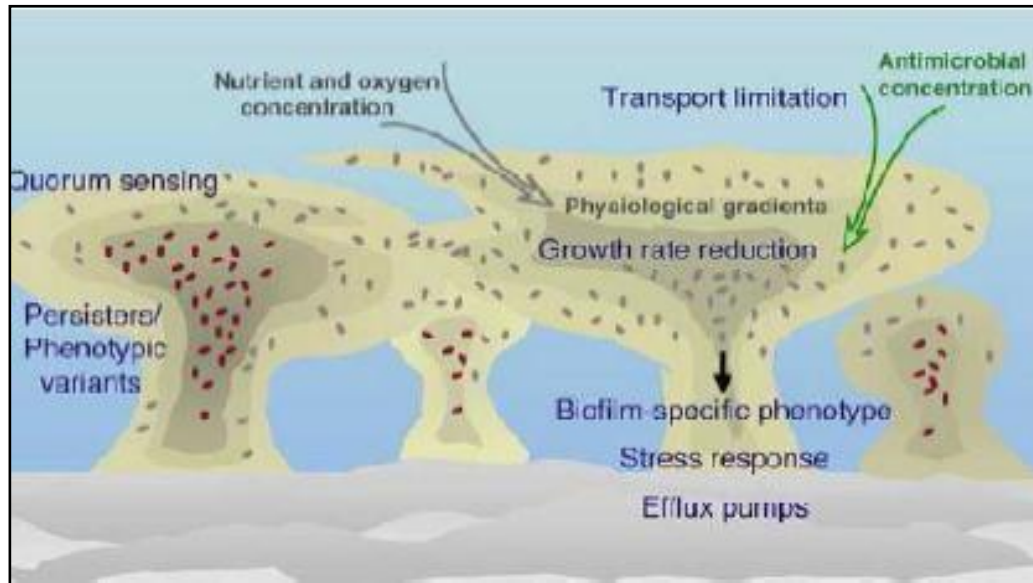


Figure 1 : Les différents mécanismes impliqués dans la résistance des biofilms (Drenkard ,2003).

II. Les bactéries Lactiques

1. Classification et identification

La classification des bactéries lactiques est essentiellement basée sur la composition de la paroi cellulaire bactérienne, incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique (C19:0) et les acides gras insaturés (C14:0, C16:0, C18:0) (**De Ambrosini et al., 1996 ; Gilarová et al., 1994**).

Une seconde classification de bactéries lactiques est focalisée sur les différents modèles de fermentation du glucose, répartie en 3 groupes (**McLeod et al., 2008**). Le groupe I renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation, composé majoritairement de *Lactobacillus*. Le groupe II inclut les bactéries l'hétérofémentation et rassemble *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Le groupe III regroupe les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* et présente une position intermédiaire entre le groupe I et II, les deux voies de fermentation de glucose (l'homofémentation, l'hétérofémentation) (**McLeod et al., 2008**).

La seconde édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (**Vos et al., 2009**) classe les bactéries lactiques dans deux embranchements distincts : Firmicutes et *Actinobacteria*. L'embranchement des Firmicutes renferme les genres les plus importants : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* qui appartiennent à l'ordre des Lactobacillales, caractérisé par une faible teneur en GC (31-49%). L'embranchement des *Actinobacteria* renferme le genre de *Bifidobacterium*, caractérisé par une teneur élevée en GC (58-61 %) (**Schleifer et Ludwig 1995 ; Klaenhammer et al. 2005 ; Horvath et al., 2009 ; Pfeiler et Klaenhammer, 2007**).

Les études d'hybridation ADN/ADN, et les séquences d'ARN ribosomiaux sont devenues des éléments essentiels dans l'identification et la classification taxonomique des bactéries lactiques (**Mäkelä al.,1992 ; Stanckebrandt et Teuber, 1988 ; Vandamme et al., 1996, Woese et al.,1990**). Actuellement, avec les technologies de la PCR et du séquençage automatique de l'ADN du gène de l'ARNr 16S, l'identification des espèces est devenue une pratique plus simple.

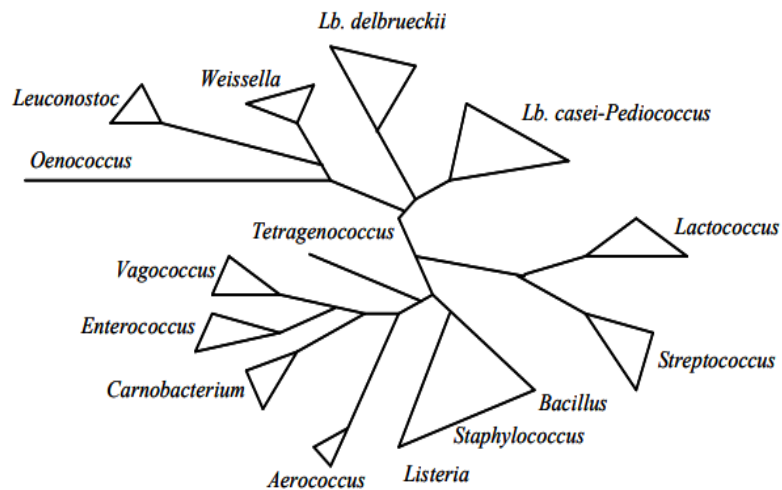


Figure 2 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004).

2. Voies métaboliques

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes :

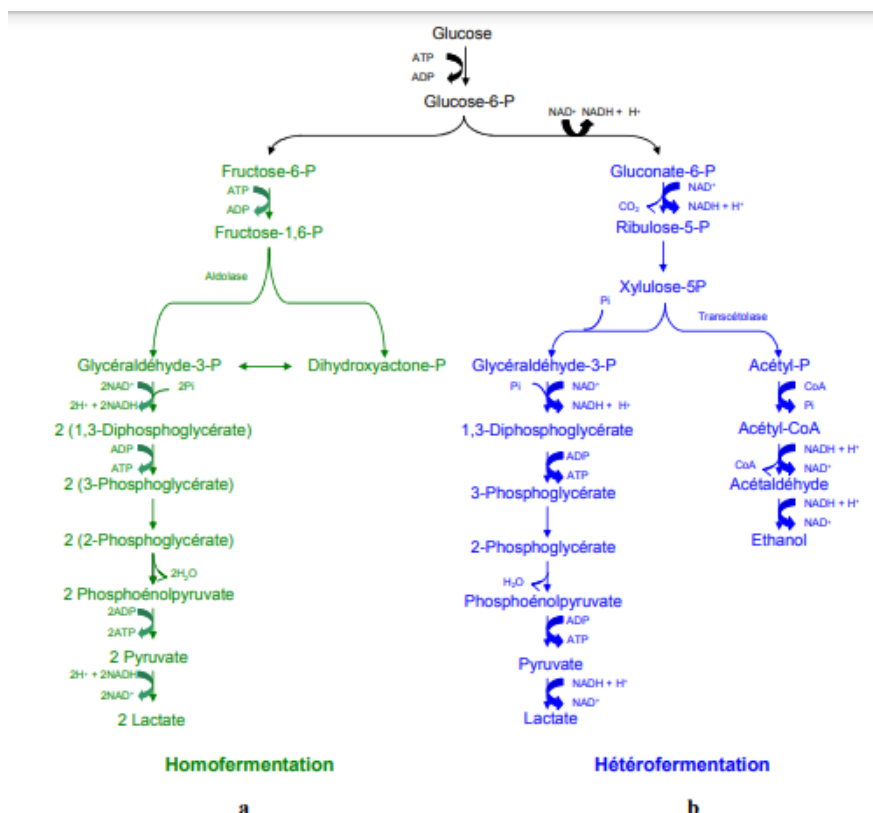


Figure 3 : Représentation schématique de principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Kandler, 1983).

3. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due principalement à la production de différents composés organiques et non-organiques capables d'inhiber la croissance de certains germes pathogènes.

3.1. Acides organiques

Les bactéries lactiques produisent différents types d'acides organiques. Lors de la production des acides organiques, la valeur du pH du milieu de culture diminue, induisant ainsi l'inhibition de la flore.

3.2. Peroxyde d'hydrogène

La catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. Il en résulte une accumulation de ce composé qui peut être inhibiteur de différents micro-organismes. L'inhibition s'effectue par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et par la destruction des structures protéiques cellulaires (**Zalan et al., 2005 ; Strus et al., 2006**).

3.3. Dioxyde de carbone

Il est formé essentiellement, au cours de la fermentation hétérolactique. Dans des conditions environnementales d'anaérobiose, le dioxyde de carbone inhibe les microorganismes aérobies. Son accumulation dans la bicouche lipidique cause un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (**Ammor et al., 2006**).

3.4. Diacétyl

Le diacétyl est un composé aromatique essentiel. De nombreuses bactéries des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, peuvent le synthétiser (**Leveau, 1991**). Le pouvoir inhibiteur de diacétyl vis-à-vis de levures, des bactéries à Gram--positif et négatif se manifeste moins sensibles (**El-Ziney et al., 1998**).

3.5. Reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est un métabolite intermédiaire de pouvoir antimicrobien. La reutéline est produite lors de la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* et d'autres genres de bactéries non lactiques telles que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (**El-Ziney et al., 1998**). La reutéline possède un large spectre d'activité et trouve des applications dans le domaine

médical et alimentaire (**Vollenweider, 2004**). Elle interfère avec la réplication de l'ADN chez les procaryotes (Gram-positif et négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires.

III. Les bactériocines des bactéries lactiques

1. Définition

Les bactériocines représentent une large gamme de peptides qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'activité et de leur mode d'action (**Klaenhammer, 1988**).

Les bactériocines des bactéries lactiques ressemblent à certains peptides antimicrobiens des eucaryotes (**Riley, 2009**). D'une manière générale, les bactériocines sont thermostables, solubles et actives à des valeurs de pH acides (**Laboui et al., 2005**), non toxiques et sensibles aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal (**Wijaya et al., 2006 ; Castellano et al., 2008**).

En outre, de point de vue physico-chimique, les bactériocines sont généralement cationiques, amphiphiles, non structurées en solution aqueuse (**Reis et al., 2012**). Leur poids moléculaire est relativement petit (2-6 kDa) ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et de perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface (**Gillor et al., 2008; Anthony et al., 2009; Simova et al., 2009 ; Hartmann et al., 2011 ; Todorov et al., 2011**).

La différence majeure entre les antibiotiques et les bactériocines est que ces dernières sont synthétisées par voie ribosomique (2) et produites au cours de la phase primaire de la croissance, cependant, les antibiotiques sont des métabolites secondaires (**Zacharof, Lovitt, 2012**).

2. Classification

2.1. Bactériocines de la classe I : Lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et ayant subi des modifications post-traductionnelles (**Willey et Van Der Donk, 2007**). Les lantibiotiques contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, telles que la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine (**Carine et al., 2009**).

Les quatre variantes, nisine A, F, Q et Z sont isolées à partir de *L. lactis*. Cependant, nisine U et U2 sont isolées à partir *S. sp* (**Piper et al., 2011**). La nisine U présente une similitude de 78% avec la nisine A, la différence étant le manque des trois résidus C-

terminaux (**Wescombe et al., 2006**). La plus récente variante, la nisine H est isolée à partir de *Streptococcus* (**O'Connor et al., 2015**).

La classe des lantibiotique est divisée en six groupes en fonction de leur homologie de séquence, les quatres groupes sont décrit par **Towmey et al (2002)**.

2.2. Bactériocine de classe II

Les bactériocines de la classe II sont de faible masse moléculaire (<10KDa) ; thermostables et ne subissent pas de modification post traductionnelle (**Dridier et al., 2009**).

2.3. Bactériocines de classe III

Les bactériocines de la classe III sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur (**Calvez , 2009**). La structure et le mode d'action des bactériocines de la classe III se différent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe renferme quatre bactériocines (**Nigotova et al., 2007**) : l'**helveticin**, l'**enterolysin A**, la **zoocin A**, la **millericin B** produites par *Lactobacillus helveticus*, *Spreptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus milleri* (**Papagianni, 2003**).

3. Régulation de la production de bactériocines par le système de « Quorum Sensing »

La production de bactériocine est souvent sous le contrôle d'un système de « Quorum Sensing » (QS), mécanisme largement présent chez les bactéries lactiques (**Kuipers et al., 1998**). Les bactéries lactiques se comportent comme des microorganismes simples lorsque les densités cellulaires sont faibles et peuvent changer de comportement en un type « multicellulaire » lors de l'atteinte d'un seuil critique de la densité de population (**Kalia, 2013**).

À ce stade, les cellules communiquent par le biais de petites molécules chimiques d'induction, synthétisées et sécrétées dans le milieu de culture et utilisent des systèmes de détection spécifiques de la concentration des molécules inductrices. Lorsque la concentration de la molécule signal atteint un seuil critique, et le comportement de la population totale sont modifiés (**Boyen et al., 2009**). La concentration externe des molécules auto-inductrices augmente en fonction de la densité cellulaire de la population (**Waters et Bassler, 2005**). En outre, les molécules d'induction sont liées à leurs récepteurs sur les cellules bactériennes et l'expression des gènes de la population totale sont modifiées et synchronisées.

4. Génétique des bactériocines

Les gènes responsables de la production de bactériocines sont fréquemment associés à des éléments mobiles, ou dans le chromosome en association avec des transposons ou des plasmides (**Van Belkum et al., 1989**). Les bactériocines de faible poids moléculaire des

bactéries Gram positives sont traduites en pré-peptides qui sont ensuite modifiés afin de former des molécules biologiquement actives (**Buchman et al.,1998**).

Parmi les bactériocines, les lantibiotiques sont synthétisées avec un peptide leader N-terminale. L'opéron de la nisine (figure 4D), génétiquement désigné *nisA* est modifié par l'action d'autres protéines codées par les gènes de bactériocines avant l'exportation (**Deegan et al., 2006**). Le gène de structure de la nisine, *nisA* fait partie d'un opéron polycistronique, trois autres gènes situés en aval ; *nisB*, *nisT* qui sont impliqués dans le transport de la nisine, ainsi que *nisC* (**Dodd et Egan,1990**).

nisC chevauche *nisT*. D'autres gènes présents dans l'opéron de la nisine incluant : *nisI*, *nisR* et *nisP*. *nisI* codent pour une lipoprotéine impliquée dans l'immunité à la nisine, cependant, *nisP* semble être impliqué dans la régulation de la biosynthèse de la nisine (**Van der Meer et al.,1993**).

Les gènes nécessaires à la biosynthèse et à l'exportation des bactériocines de classe II (figure 4 A, B et C) diffèrent des lantibiotiques en raison de l'absence de modifications post-traductionnelles (**Deegan et al., 2006**). Plusieurs gènes de structure de bactériocines non-lantibiotiques sont localisés dans des plasmides (**Jack et al.,1995**).

Dans la plupart des opérons de bactériocines, les déterminants génétiques associés à la production de bactériocines biologiquement actives comprennent : (i) le gène de structure, codant la pré-pro-bactériocine ; (ii) le gène codant la protéine d'immunité ; (iii) les gènes responsables de la production et le transport, (iv) des gènes codant la production des enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles (cas de la nisine) (**figure 4**)(**Cintas et al., 2001**).

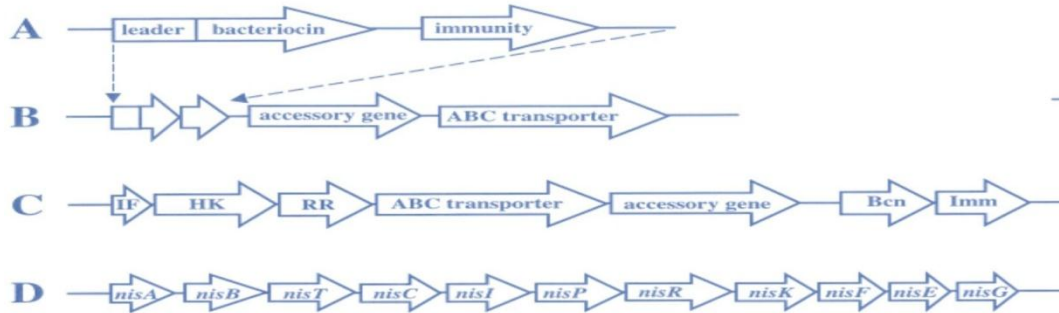


Figure4: Arrangement schématique des gènes codant la production de bactériocine de classe II par rapport aux gènes de production de nisine (Van Belkum et Stiles, 2000).

A : Gènes de structure d'une bactériocine de classe II, divergicine A (Worobo *et al.*, 1995) une bactériocine qui est sécrétée par la voie "sec", son gène de structure requiert la pré-bactériocine (peptide leader + Bactériocine) et le gène de l'immunité.

B : Gènes de structure de la pédiocine PA-1/AcH, (Marugg *et al.*, 1992), une bactériocine de classe II non régulée avec un peptide leader de type double glycine. Les gènes codant le transporteur ABC et les protéines accessoires sont requis.

C : Gène de structure d'une bactériocine de classe II, la carnobactériocine B2 (Quadri *et al.*, 1997), contient les gènes de structure B et d'autres gènes, codant IF : facteur inducteur ; HK (histidine kinase) : protéine de régulateur et RR : régulateur de réponse.

D : Gènes requis de la production du lantibiotique, la nisine A. nisA : prépronisine, nisBC : modification de la pronisine, nisT : transport de la nisine, nisP : peptide leader protéase, nisRK : régulation de la nisine, nisIFEG immunité à la nisine.

Des études antérieures sur la structure-fonction des bactériocines ont révélé des bases moléculaires de la spécificité du ciblage et du mode d'action de la bactériocine. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation, la biosynthèse, la translocation et l'immunité de la bactériocine devrait faciliter les tentatives d'optimisation de la production de bactériocine. Elle pourrait aussi ouvrir la voie à des modifications dirigées *in vitro* afin d'améliorer leurs spectres antibactériens (Jack *et al.*, 1995). L'utilisation des techniques de mutagenèse dirigée, de la génomique et de la protéomique est une opportunité réelle pour une construction possible de nouvelles familles de peptides avec une activité antimicrobienne accrue ou des caractéristiques de stabilité et de spécificité améliorées (Parada *et al.*, 2007).

5. Domaines d'applications des bactériocines

5.1. Typage bactérien

Le pouvoir inhibiteurs des bactériocines de certaines souches pathogènes est largement utilisé dans l'identification d'espèces de différents genres bactériens. La plupart des méthodes sont basées sur l'inhibition de la souche témoins de l'activité inhibitrice. Cependant, l'utilisation des bactériocines a permis de différencier les souches de *Shigella* (Pitt et Gaston 1995 ; Merino *et al.*,2000).

5.2. Domaine alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (Ryan *et al.*,1998). Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines a permis d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (Harlander, 1993). Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention. En effet, de nombreuses bactériocines ont montré leurs effets synergiques ou même additionnels lors de leur utilisation en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des agent conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels (Grande *et al.*,2007).

L'utilisation combinée de bactériocines peut construire une approche attirante, permettant l'inhibition le développement de souches résistantes. La combinaison de bactériocines avec des traitements physiques, tels que le traitement à haute pression et dans un champ électrique, offre une conservation plus efficace des produits alimentaires, fournissant ainsi une barrière complémentaire aux formes les plus résistantes telles que les endospores bactériennes (Galvarez *et al.*,2007).

Malgré, que la majorité des bactériocines sont des substances naturelles non toxiques, seule la nisine est reconnue jusqu'à maintenant comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (Delves-Broughton, 1990).

Cependant, la nisine est utilisée comme additif dans les aliments en conserves, notamment dans les produits laitiers, les soupes et les poudings à base de céréales (Eckner *et al.*,1992).

Par ailleurs,(Rayman *et al.*,1981) ont rapporté sur l'interaction synergique entre la nisine et les nitrites vis-à-vis des spores de *Clostridium botulinum*, permettant la réduction des substances cancérogènes.

A ce jour, plus de 45 pays ont approuvé l'utilisation de la nisine comme agent de

conservation, ceci explique l'utilisation massive de la nisine à travers le monde (**Riley et Wertz, 2002**).

5.3. Domaine de la médecine humaine

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques dans la lutte et la prévention des infections a engendré de sérieux problèmes de toxicité et de résistance.

Les bactériocines sont énormément appréciées lors de leur utilisation comme agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, car l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie. Quelques lantibiotiques ont trouvé des applications médicales pour l'homme et l'animal.

L'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* est active vis-à-vis de *Propionibacterium acnes*, germe responsable de l'acné (**Allgaier et al., 1986**).

Ce lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application a montré plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques et leur faible coût de production par rapport aux antibiotiques.

5.4. Domaine vétérinaire

Dans le domaine de la médecine vétérinaire, les bactériocines pourraient être utilisées avec les ionophores dans une stratégie visant la prévention de l'apparition d'une résistance. L'utilisation des bactériocines à la place des antibiotiques, par intermittence, a aidé pour la destruction des populations résistantes.

Les ionophores antibiotiques ont un très large spectre d'action, peuvent agir sur la moitié de la flore naturelle trouvée dans le rumen des bovins. En outre, les bactériocines sont des protéines non toxiques qui se digèrent facilement. A l'opposé, les ionophores antibiotiques classiques sont indigestibles, très toxiques et doivent être manipulés et administrés avec précaution.

5.5. Domaine agricole

La protection des plantes vis-à-vis de microorganismes phytopathogènes et la préservation des semences, sont les objets de l'exploitation des bactériocines en agriculture. Dans ce cas, les substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées pour la lutte contre les ravageurs phytopathogènes (**Paik et al., 1997**).

6. La limite de l'utilisation des bactériocines

L'utilisation des bactériocines peuvent présenter des effets additifs ou synergiques lors de leur utilisation en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, y compris des produits

chimiques, des emballages, des traitements thermiques ou non thermiques (**Gounadaki *et al.*, 2008**).

L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, cependant, leur mise en oeuvre est pratiquement très difficile. En effet, les propriétés des bactériocines ont favorisé leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et médical. Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante.

2. Matériel et méthodes

I. les bactéries lactiques

1. Collecte des échantillons

Les échantillons de lait cru sont prélevés à partir de différents biotopes : Lait de chèvre et lait de chamelle provenant de fermes d'élevage situées dans la région de Ouargla (**Hassi Ben Abdallah, Elbour, Taibet**).

Les prélèvements sont réalisés dans des conditions aseptiques, transportés au laboratoire d'analyse microbiologique. Un total de 25 échantillons est collecté. Les pis sont lavés à l'eau savonneuse, rincés à l'eau javellisée et séchés, les 2 premiers jets sont éliminés et le lait est recueilli dans des flacons stériles (100 ml/flacon).

2. Isolement des bactéries lactiques

2.1. Enrichissement et préparation des dilutions décimales

Dans un flacon stérile, un volume de 10 ml de lait cru est mélangé avec 90 ml du bouillon tryptone sel afin d'obtenir une population bactérienne d'une dilution décimale de 10^{-1} . des dilutions décimales préparées sont inoculés dans le bouillon Tryptone sel, incubés à une température de 30°C pendant 24 heures (**Guiraud et al., 1998**).

Kamariya et J'ben

Une pesée de 5g est broyée introduite dans un volume de 45ml d'eau physiologique peptonée stérile, homogénéisé à l'aide d'un Vortex et des dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} sont préparées. Un volume de 1ml des trois dernières dilutions est ensemencé en profondeur dans un milieu de culture MRS, incubées en anaérobioses à une température de 30°C pendant (48-72 heures (**(Badis et al., 2005 ; Mathot et al., 1994; Khedid et al., 2006)**).

3. Purification

Les colonies isolées sont repiquées d'une manière alternée sur MRS liquide et solide. Ensuite, les colonies isolées sont ensemencées sur milieu de culture MRS solide, transférées sur MRS liquide (**Ghazi et al., 2009**).

4. Conservation des souches

4.1. La conservation à court terme

La conservation colonies isolées, purifiés est réalisée par ensemencement sur la surface milieu de culture MRS gélosé incliné, incubé à une température 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à une température de 4°C, Des repiquages successifs sont réalisés toutes les trois semaines (**Saidi et al., 2002**).

4.2. La conservation à long terme

A partir des jeunes cultures (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à une vitesse de 4000 t/min pendant 10 min. Ensuite, le surnageant est éliminé et le milieu de culture de conservation est ajouté au culot. Le milieu de culture de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à une température de -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé contenant à une concentration de 0,5% d'extrait de levure (**Badis et al., 2005**).

5. Identification primaire du genre

5.1. Etude morphologique

Observation macroscopique

Les colonies isolées sont identifiées selon l'apparence macroscopique, leur forme, leur contour et l'aspect de leur relief et leur texture (**Trotel-Aziz et al., 2008**).

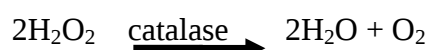
Observation microscopique

L'observation microscopique au grossissement (Gx100) a permis de classer les bactéries selon la coloration de Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

5.2. Tests biochimiques

5.2.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Une réaction positive du catalase se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2), après inoculation d'une culture bactérienne avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes (**Marchal et al., 1991**).

5.2.2. Type de fermentation

La mise en évidence de la production du CO_2 à partir du glucose s'effectue lors de l'inoculation d'un tube à essai contenant le bouillon MRS glucosé, dépourvu d'extrait de viande et de citrate et muni d'une cloche de Durham. Une réaction positive se manifeste par la production de gaz (CO_2) dans la cloche de Durham, incubée à une température de 30°C pendant 18-72h (**Schillinger et Lucke, 1989 ; Hariri et al., 2009**).

6. Identification des espèces

6.1. Effet de la température sur la croissance des souches antagonistes

Dans le but de différencier les souches thermophiles des mésophiles, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS sontensemencés avec les bactéries lactiques sélectionnées antagonistes, incubés à différentes températures (4, 10, 37, 42°C). La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après (24-48 hs) d'incubation (Guiraud, 2003).

6.2. Effet du pH sur la croissance des souches antagonistes

Dans le but d'explorer l'effet de la valeur du pH sur la croissance des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS, ajusté à différentes valeur de pH (4.8, 6.5, 9.4) , sont inoculés et incubés à 30C° pendant 48-72 heures(Guessas et Kihal, 2004).L'évaluation de effet du pH sur l'activité antagoniste des souches sélectionnées est déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition formé autour du disque imprégné de surnageant.

6.3. Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des souches antagonistes

Dans l'objectif d'apprécier la croissance des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes à différentes concentration de NaCl, des tubes à essai contenant le milieu de culture liquide de MRS, additionné de différentes concentrations de NaCl (3.5-6.5 %), sont inoculés avec les souches sélectionnées antagonistes, incubées à une température de 37°C, pendant 24 heures (Carr *et al.*, 2002).

6.4. Fermentation des sucres

Dans le but d'identifier les bactéries lactiques sélectionnées antagonistes sur la base de la fermentation des sucres. Un total de 11 sucres: Galactose, Mannose, Lactose, Fructose, Arabinose, Glucose, Xylose, Saccharose, Mannitol ,Maltose et Esculine. Pour établir leur profil fermentaire.

Des microplaques d'Eliza sont utilisées, les souches isolées sont inoculées dans les différents milieux, incubées pendant 24heures. Ensuite, la biomasse est récupérée par centrifugation à une vitesse de (8000 rpm pendant 15 min, lavée deux fois avec de l'eau peptonné saline. Le culot est ensuite retenu et introduit dans un volume de 1ml d'eau peptonné saline (Guessas *et al.*, 2012).

Un volume de 100 µl de la biomasse bactérienne, contenant l'indicateur coloré (le pourpre de bromocrésol), additionnée de sucrées, à raison de 2% est introduit dans la microplaque.

Ensuite, les microplaques sont recouvertes d'une couche d'huile de paraffine stérile afin d'assurer l'anaérobiose. Les cultures sont incubées à 30 et 37°C de 24-48 heures.

La lecture positive se traduit par le virage de la couleur du milieu de culture du violet au jaune (**Badis *et al.*, 2005**).

6.5. Hydrolyse de l'arginine

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'arginine chez les bactéries lactiques sélectionnées antagonistes est effectuée sur le bouillon de Möeller, exemptes d'arginine, additionné d'une concentration 1% d'arginine (**Möeller, 1955**).

Des colonies fraîches sont ensemencées dans des tubes, recouverts d'huile de paraffine stérile, incubées à une température de 30°C pendant (24-48 heures). La lecture positive de l'hydrolyse de l'arginine se manifeste par l'apparition de la couleur violette ors de la libération l'ammoniaque (**Larpen, 1997**).

6.6. Activité protéolytique

Des cultures âgées de 24 heures de bactéries lactiques sélectionnées antagonistes sont ensemencées par touche sur la surface de la gélose du milieu de culture de PCA, additionné d'une concentration de 4.5% de lait écrémé. Une lecture positive de l'activité protéolytique se traduit par la formation d'un halo clair autour de l'inoculation bactérienne après l'incubation à 30°C pendant (18-24 heures) (**Sonar et Halami, 2014**).

7. Identification de l'espèce par galerie API 50CHL

L'identification des bactéries lactiques isolées, sélectionnées antagonistes, est effectuée par l'étude du profile de la fermentation des hydrates de carbone sur une galerie API 50 CH

Les galeries API 50 CHL de BioMérieux (France) a permis l'identification des bactéries lactiques par l'étude de la fermentation de 49 sucres différents.

Les bactéries lactiques isolées, sélectionnées antagonistes sont purifiées par des repiquages successifs sur milieu de culture gélosé de MRS,

Les colonies sont introduites dans le milieu de culture API 50 CHL avec une opacité de McFarland (BioMérieux) (densité des cellules équivalente à 6.10^8 UFC.mL⁻¹), inoculées dans les cupules de la galerie API 50 CH, incubées à 37°C pendant 48 heures, En aérobiose, le catabolisme des glucides permet la production d'acides organiques, traduit par le virage de la couleur du milieu de culture. Les résultats obtenus de la fermentation de 49 sucres de la galerie sont traités par le logiciel ApiWeb (BioMérieux).

II. Souches pathogènes multirésistantes

1. Prélèvement des échantillons



Le recueil des échantillons est effectué entre 19 Février-30 Mai 2019 à partir du service de réanimation de l'hôpital Mouhamed Boudiaf de Ouargla. 75 prélèvements sont effectués à partir de malades et de surfaces inertes et du matériel médical).

Les différents types de prélèvements sont réalisés par aspiration trachéale chez les patients intubés trachéotomisés et par écouvillonnage à partir de plaies, de cathéters et d'hémoculture et par l'utilisation de sondes urinaires.

Les échantillons recueillis sont ensuite acheminées dans une glacière vers le laboratoire d'analyse. Une fiche de renseignement accompagne chaque prélèvement, comportant le sexe, l'âge et la nature de la pathologie (**Annexe2**).

L'étude du spectre d'action des bactéries lactiques et leurs bactériocines vis-à-vis de bactéries pathogènes multirésistantes, de nombreuses souches de différents genres bactériens est effectuée.

2. Isolement et purification des isolats cliniques

L'isolement est réalisé sur trois milieux de cultures : gélose Chapman (Merck), gélose Hektoen (Bio-Rad) et gélose au sang (Bio-Rad) et l'incubation à une température 37°C pendant 24-48 heures. Ensuite, des repiquages successifs sont procédés sur des milieux de cultures liquide bouillon BHIB (Fluka) et bouillon nutritif (Fluka) et milieu gélosé sélectif pour la purification des souches isolées.

3. Identification des isolats cliniques

3.1. Identification des Staphylocoques

Les souches à Gram positif isolées, sont identifiées par des techniques microbiologiques standards telles que la coloration de Gram, catalase et de coagulase) et par l'utilisation de la galerie système ID 32 STAPH (Biomérieux).

-Recherche de la coagulase

La coagulase libre est une enzyme présente chez *S.aureus*, *S.intermedius*, *S.hyicus*. La mise en évidence de la présence du coagulase libérée dans le milieu extérieur est explorée par l'ajout dans un tube à hémolyse un volume de 0.5 ml du plasma humain et un volume de 0.5 ml d'une culture de *Staphylocoque* agée de 24 heures. Le mélange est incubé à l'étuve à 37°C. Une lecture positive se manifeste par la formation d'un coagulum souvent les trois premières heures de l'incubation (**Garnier et Denis ,2007**).

-Identification par le système ID 32 STAPH (BioMérieux)

La galerie ID 32 STAPH comporte 32 cupules, dont 26 sont utilisées comme cupules tests contenant un milieu réactionnel déshydraté, la préparation de l'inoculum s'effectue dans un Medium d'API, par l'inoculation d'une culture jeune. L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0.5 Mac Farland ou à une DO de 0.08-0.10, mesurée à une longueur d'onde de 625 nm. Les réactions obtenus après l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

3.2. Orientation de l'identification des bactéries pathogènes à Gram négatif

Lors de l'obtention de colonies pures, une caractérisation morphologique (forme, taille, couleur et aspect, la coloration de Gram et l'observation microscopique et des réactions de la présence du catalase et oxydase, des souches isolées, sélectionnés sont réalisés (Meziani, 2012).

a. Testes biochimiques**-Production de l'indole**

La mise en évidence de la production de l'indole est effectuée lors de l'ensemencement des souches isolées, sélectionnées dans de l'eau peptonnée exempte d'indole et l'incubation à une température de 37°C pendant 18 heures. La lecture positive se manifeste par la formation d'un anneau rouge après l'ajout du réactif de Kovacs.

-Etude des voies de fermentation de glucose (test RM et VP)

La mise en évidence de la fermentation de glucose est effectuée sur le milieu de culture de Clark et Lubs, ensemencé préalablement avec les souches isolées, incubées à 37°C pendant une durée de 18 heures. Ensuite, le milieu de culture ensemencés est réparti en deux tubes.

-Test VP (Voges-Proskauer)

La mise en évidence de la production d'acétoïne au cours de la fermentation par la voie du butane-diol en présence de réactif VP (l'ajout de quelques gouttes du réactif VPI et le même volume du réactif VP II). La lecture positive de la production de l'acétoïne se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge, après quelques minutes.

-Test du rouge de méthyle

La mise en évidence de la réaction au rouge de méthyle est effectuée par l'ajout de 2-3 gouttes de rouge de méthyle. La lecture positive de la production des acides mixtes se manifeste par l'acidification du milieu de culture glucosé et l'apparition d'une couleur rouge.

-Utilisation du citrate

La mise en évidence de l'utilisation de citrate est effectuée par l'ensemencement de la pente du milieu de culture, l'incubation à une de 37°C, pendant 18 heures. La lecture positive de la dégradation de citrate se manifeste le bleuissement du milieu de culture.

b.API 20E et API 20NE(bioMérieux, France)

La galerie API 20E permet la recherche de 20 caractères biochimiques (microcupules) par des réactions enzymatiques. Ces microcupules contenant des substrats déshydratés sont inoculées avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. Les réactions produites se traduisant par des virages colorés spontanés ou révélés par addition de réactifs. La révélation des résultats s'effectue à l'aide de l'utilisation de l'API web (catalogue d'identification des entérobactéries) (**Toutou Sissoko, 2006**).

4. Antibiogramme des souches isolées

La mise en évidence de la résistance des souches isolées de bactéries vis-à-vis des différents antibiotiques est effectuée par la méthode de diffusion sur milieu de culture gélosé de Mueller-Hinton selon les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CASFM-EUCAST, 2018**).

La surface du milieu de culture gélosé de Mueller-Hinton est ensemencée, à l'aide d'un écouvillon, à partir d'une culture bactérienne jeune (18-24 heures) à 0.5 Mac Farland ($\approx 10^8$ UFC/ml). Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface des géloses à l'aide d'un distributeur automatique. Les boîtes sont ensuite incubées à une température 37°C.pendant (18-24 heures). Les diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, et l'interprétation des résultats obtenus (bactérie Sensible (S), Intermédiaire (I), Résistante (R)) est réalisée selon les critères définis par le CA-SFM .

5. Détection phénotypique des mécanismes de résistance des souches multirésistantes utilisées

5.1. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines

-Test de synergie

La production d'une BLSE est mise en évidence à l'aide de test de synergie réalisé sur gélose Mueller-Hinton. Des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (céfotaxime et ceftazidime) et céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G) (céfépime) sont placés à 2 cm d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (**Figure 5**). La présence d'une BLSE est caractérisée par la description d'une image de synergie en « bouchon de champagne » en raison de l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique (**Jarlier et al.,1988**).

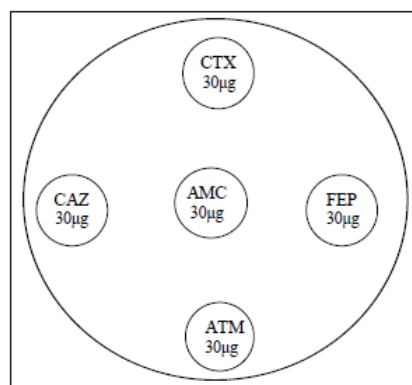


Figure 5 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.

-Test à la cloxacilline

La présence d'une céphalosporinase est mise en évidence par la détermination des diamètres des zones d'inhibitions de la céfoxitine, de la ceftazidime et du céfotaxime sur la surface de la gélose de Mueller-Hinton, additionnée de cloxacilline, inhibiteur de céphalosporinase, à 250 µg/ml (**Drieux *et al.*, 2008 ; Philippon et Arlet, 2006**).

Les diamètres des zones d'inhibitions formés autour de la ceftazidime et du céfotaxime restent stables lors de la production de BLSE associée à la production de céphalosporinase.

-Test du double disque

La détection de la bêta-lactamase à spectre étendu est confirmée par le test de double disque, qui consiste la recherche de l'augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de **C3G**, précédé par l'application d'un disque contenant l'association amoxicilline, acide clavulanique (**AMC**), comparé à un autre disque de céphalosporine est placé sur la gélose Muller Hinton (**Rehal *et al.*, 2005**).

Le test du double disque est positif lorsque le diamètre de diffusion de C3G(CTX), appliquée après diffusion d'AMC est égale ou supérieure à 5mm par rapport le diamètre de diffusion de C3G(CTX)(**Figure 6**).

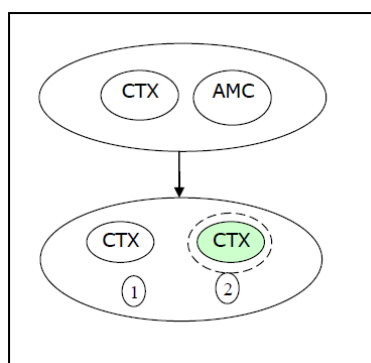


Figure 6 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque (**Rahal *et al.*, 2005**).

5.2. Détection phénotypique des mécanismes de résistance des Staphylocoques

Le *Staphylocoque* doré méticilline résistant (MRSA) est un *staphylocoque* sur lequel certains antibiotiques ont perdu leur efficacité.

Selon les recommandations du CA-SFM, la détection de la résistance nécessite l'emploi de conditions particulières par l'utilisation d'un fort inoculum et un milieu Mueller-Hinton hypersalé incubé à 37°C.

La méthode de diffusion sur la gélose de Mueller-Hinton consiste au dépôt de disques d'oxacilline, pénicilline, amoxicilline et amoxicilline+ acide clavulanique, ensemencée avec une suspension bactérienne des germes testés (**Figure 7**).

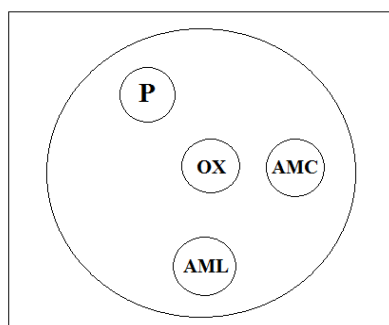


Figure 7 : Mise en évidence de la détection des SARM.

III. Bactériocines

1. Criblage des souches antagonistes

Le principe de la détection de l'activité antimicrobienne est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture solides ou semi-solides et l'inhibition de la croissance des micro-organismes indicateurs sensibles. Le milieu MH (Mueller Hinton), ajusté à une valeur de pH de 7,1 est utilisé pour l'étude de l'activité antagonistes des bactéries lactiques isolées vis-à-vis de bactéries pathogènes hospitalières multirésistantes (**Mami et al., 2014**).

La recherche de la production d'éventuelle substances inhibitrices par les bactéries lactiques isolées est réalisée selon deux méthodes : la méthode des spots « the spot on the lawn » et la méthode des puits «AWDA».

1.1. Méthode des spots

La méthode décrite par **Fleming et al., (1975)**, est adoptée et l'ensemencement des bactéries lactiques dans le milieu de culture MRS et les bactéries pathogènes dans le bouillon de Cœur Cerveau en double couche. Un spot de 5 µl de la suspension de bactéries lactiques âgée de 24 heures, préalablement ajustée à une densité optique de 1 ± 0.05 , mesurée à une longueur d'onde 550 nm, est déposée à la surface de la gélose MRS. Incubées pendant 24 à

48 h à 30°C en aérobiose.

Les géloses sont ensuite recouvertes avec un volume 10 ml de gélose molle Mueller Hinton (7g/l d'agar), préalablementensemencée avec un volume de 0.1 ml de la suspension bactérienne de la souche témoin de l'activité inhibitrice, la densité optique est ajustée à 1 0.05, mesurée à une longueur d'onde 550 nm , incubées à 37°C en aérobiose pendant 24heures. L'activité positive est révélée par la formation de la zone autour des colonies.

1.2. Méthode des puits

Méthode décrite par **Barefoot et al., (1983)**, a permis de mettre en évidence l'activité antagoniste du surnageant de la souche lactique productrice de substance antimicrobienne avec la souche témoin de l'activité inhibitrice test.

Les souches de bactéries lactiques sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Le surnageant est ensuite récupéré par centrifugation à une vitesse de 15000 g pendant 10 min , neutralisé avec une solution de 1N NaOH à une valeur de pH comprise entre 6,5-7, filtré à l'aide d'un filtre millipore stériles de diamètre 0,22 µm et conservé.

La surface de la gélose MRS solide estensemencée avec le germe témoin de l'activité de l'antagoniste et un volume de 100 µl du surnageant de la souche sélectionnée antagoniste est introduit dans les puits. Ensuite, les cultures sont incubées à une température de 30°C, pendant (24-48 heures). Une lecture positive de l'activité antagoniste se manifeste par la formation d'une zone d'inhibition autour des puits avec un diamètre supérieur de 2 mm (**Hwanhlem et al., 2011**).

2. Caractérisation de l'agent antagoniste

2.1. Détermination de la thermorésistance

Dans le but de déterminer la stabilité thermique de l'agent responsable de l'activité antagoniste, les surnageants sont traités à différentes températures de (40, 70, 90, 100 °C) pendant 30 min et à 120°C pendant 20 min (**Hammami et al., 2012**). Après refroidissement, l'activité antagoniste est mise en évidence vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. La lecture des résultats est précédée par comparaison des résultats obtenus avec les surnageants traités et le surnageant non traité thermiquement.

2.2. Détermination du pH optimum

Dans le but d'explorer le pH optimum de l'agent responsable de l'activité antagoniste, le surnageant récupéré par centrifugation est ajusté avec une solution de 1N NaOH entre 4-7, filtré à l'aide d'un filtre Millipore stériles de diamètre 0,22 µm. Ensuite, l'activité antagoniste

des surnageants est mise en évidence vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, incubées à une température de 37°C, pendant 1 heure par la méthode des disques (Anastasiadou *et al.*, 2008).

2.3. Effets des enzymes protéolytiques

Afin de déterminer la nature des substances responsables de l'activité antagoniste, les cultures lactiques sont traitées par deux enzymes protéolytiques, la trypsine et la pepsine. Les surnageants des souches sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) récupérés par centrifugation sont ajoutés aux enzymes Trypsine et Pepsine à des concentrations de 1mg/ml ajusté à une valeur de pH de 6,5, incubés à 37°C pendant 1 heure. La réaction enzymatique est stoppée par un traitement thermique à 65°C pendant 10 mn (Vinod Kumar *et al.*, 2006) .

3. Purification partielle de la bactériocine

Les souches des bactéries lactiques sélectionnées antagonistes sont cultivées dans un bouillon MRS à une température de 37°C pendant 24 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse 12000 g à une température de 4°C pendant 15 min,

Ensuite, le surnageant obtenu est saturé à 60% par l'ajout progressif de 36.1% (P/V) de sulfate d'ammonium, avec une agitation modérée à 4°C pendant 2 heures. Une seconde centrifugation est réalisée, le culot obtenu est dissout dans une solution tampon de 20 mmole phosphate de sodium, ajusté à une valeur de pH 6,0. La solution obtenue est soumise à une dialyse à 4°C avec agitation contre de l'eau distillée pendant 24 heures, stérilisée par filtration sur membrane (0.22 µm), conservée (Culter, 2004; Abbabsa, 2012).

4. Détection de l'activité bactériocinogène

La concentration des bactériocines éventuellement produites chez les souches lactiques est procédée selon deux méthodes : la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium et d'extraction par solvants.

-Extraction par solvants

L'extraction par solvants est élaborée suivant le protocole de (Burianek et Youcef., 2000).

Un volume de 100 ml de culture agée de 24 heures de la souche isolée, sélectionnée antagoniste est centrifugé à une vitesse à 6000 rpm pendant 20 min. Un volume de chloroforme (v/v) y est additionnée au surnageant récupéré, agité vigoureusement pendant 20 minutes, transféré dans un entonnoir de séparation. La couche d'interface formée entre les phases aqueuse et organique, contenant la bactériocine, est récoltée et le chloroforme résiduel est éliminé. L'activité bactériocinogène est mesurée dans les phases aqueuse et organique (Mezaini *et al.*, 2009).

5. Mode d'action de la bactériocine

Dans le but d'explorer l'effet des bactériocines partiellement purifiées sur la croissance des germes témoins de l'activité antagoniste *Staphylococcus aureus*, deux cultures de la souche témoin de l'activité antagoniste sont inoculées sur bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C avec agitation.

Un volume de 1 ml du surnageant des souches de bactéries lactiques sélectionnées antagonistes de dilutions décimales (10^{-1} - 10^{-6}) est ajouté aux cultures des germes témoins de l'activité antagoniste *Staphylococcus aureus*, inoculée dans un milieu de culture. Des prélèvements à des intervalles de temps réguliers sont effectués pour l'évaluation de la croissance bactérienne.

6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB

Dans le but de déterminer la concentration minimale inhibitrice une série de dilutions décimales à partir du surnageant des souches témoins (neutralisé et filtré) sont réparties dans des tubes à essai stériles selon la méthode décrite par **Meira et al.(2000)**.

Des proportions de (20, 40, 50 , 60, 80 et 100 %) de surnageant de culture de bactéries lactiques isolées, sélectionnées antagonistes sont ajoutées dans des tubes à essai , contenant le milieu de culture MRS liquide, ensemencés avec un volume 50 µl des souches indicatrices (DO_{600nm} de 0,05), incubées à une température de 30°C pendant 24 heures (**Benmouna , 2019**).

la CMI est la plus petite dilution décimale dans laquelle aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée. La détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) est réalisée par inoculation d'un volume de 100µl des échantillons sur milieu MRS solide et l'incubation à 30°C accompagnée avec l'absence de la croissance bactérienne visible macroscopiquement.

-Microméthode

Dans le but de déterminer la concentration minimale inhibitrice une série de dilutions décimales du surnageant des souches témoins de l'activité inhibitrice (neutralisé et filtré) sont réparties dans les cupules d'une microplaque polystyrènes (96 wells microtest, USA) (**Verheul et al., 1997**). Un volume de 200 µl de l'extrait est déposé dans les puits, La cupule reçoit par la suite le même volume d'une préculture de la souche indicatrice pathogènes multirésistantes, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures. Après incubation, L'activité des bactériocines est déterminée en mesurant de la turbidité, (**Daba et al., 1991 ;Saint-Hubert et al., 2009**).

7. Dépistage de la production de biofilm des souches sélectionnées multirésistantes /Quantification de la formation de biofilm

La détection de la formation de biofilm est réalisée par la méthode décrite par (Christensen *et al.* 1985).

Les souches cliniques sélectionnées multirésistantes sont ensemencées sur milieu de culture liquide (Bouillon BHIB et Bouillon nutritif), incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. La densité optique des cultures inoculées est ajustée à 10^8 UFC/mL. Les puits de la microplaque sont remplis avec la culture ajustée, les microplaques sont ensuite recouvertes, scellées stérilement, incubées à 37°C pendant 48heures. Ensuite, les puits de la microplaque sont vidés et lavés avec une slution tampon de phosphate saline(TPS), ajusté à une valeur de pH de 7,2, pour l'élimination des bactéries libres (planctoniques).

Les biofilms formés des bactéries adhérentes (sessile) dans les microplaques sont fixés avec une solution de l'acétate de Sodium (2%) et les cellules adhérentes sont colorées avec du cristal violet (0,1%) pendant 30min.

L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée stérile et les microplaques sont séchées . La quantité de cristal violet solubilisé est mesurée par mesure de l densité optique à une longueur 'onde de 570nm à l'aide d'un lecteur ELISA AutoReader.

8. Effet inhibiteur de surnageants sur la formation de biofilm

L'inhibition de la formation de biofilm des bactéries pathogènes multirésistantes par des surnageants de bactéries lactiques sélectionnées antagonistes est réalisée par la méthode décrite par (Vuotto *et al.*,2014) .

Un volmue de 200µl d'une culture bactérienne témoin de l'activité inhibitrice de la formation de biofilm, est inoculé dans le milieu de culture liquide, additionné d'une concentration de de 1% de glucose, déposé dans les puis de microplaque. En outre, un volume de 50µl de surnageant de culture bactérienne est ajouté à un volume de .250µl d 'une culture de bactérie témoin de l'activité inhibitrice, incubées à une température de 37°C pendant 24heures. La mesure de la quantité de biofilm formé par les bactéries indicatrices est mesurée selon la méthode décrite par Christensen *et ses collaborateurs* (1985).

3. Résultats et discussion

I. Infections hospitalières à BMR

1. Prélèvement

Un nombre total de (75) prélèvements est effectué à partir de 15 patients admis au service de réanimation de l'hôpital MOHAMMED BOUDIAF de Ouargla: 20 prélèvements de liquides pathologiques (prélèvements de sécrétion pulmonaire, ECBU, pus, plaie, crachat), (25) à partir des dispositifs médicaux (sonde d'aspiration, sonde d'intubation, sonde urinaire, cathéter périphérique et central) et 30 prélèvements (les mains du personnel, blouse, les draps, l'air, lavabo et les bords de lits) **Tableau 1**.

Tableau 1 : Nombre de prélèvements effectués dans le service de réanimation.

Type de prélèvement	Service de réanimation		
	Liquide pathologique	Dispositifs médicaux	Environnement
	Sécrétions pulmonaire (7) ECBU (6) Pus (3) Crachat (3) Plaie (1)	Sonde d'aspiration (4) Sonde d'intubation (5) Sonde urinaire (8) Cathéter périphérique (7) Cathéter central (1)	Personnel (5) L'air (5) Blouse (3) Mur (3) Draps (6) Lavabo (4) Bord de lit (4)
Nombre total	(20)	(25)	(30)

2. Isolement et identification des souches hospitalières

Les prélèvements effectués au niveau du service de réanimation de l'hôpital Mohamed Boudiaf de Ouargla pendant la période du 19 Février-30 Mai 2019, ont permis l'isolement un nombre total de 63 bacille à Gram négatif (82%) et 14 cocci à Gram positif (18%) (**Figure 8**).

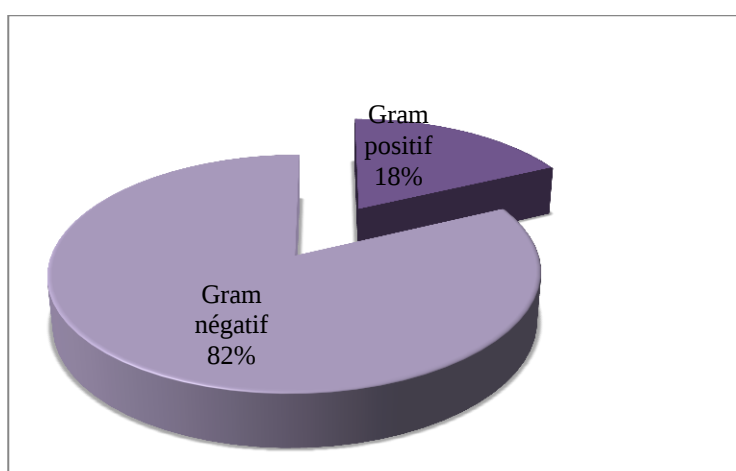


Figure 8 : Répartition des isolats cliniques selon la coloration de Gram.

2.1. Identification des *Staphylocoques* et répartition

2.1.1.Aspect des colonies

Sur le milieu Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques du genre *Staphylococcus*, le développement bactérien sur le milieude Chapman ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries (entérocoques) peuvent y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, si non les colonies sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre après 48h d'incubation à 37 C (Figure 9).

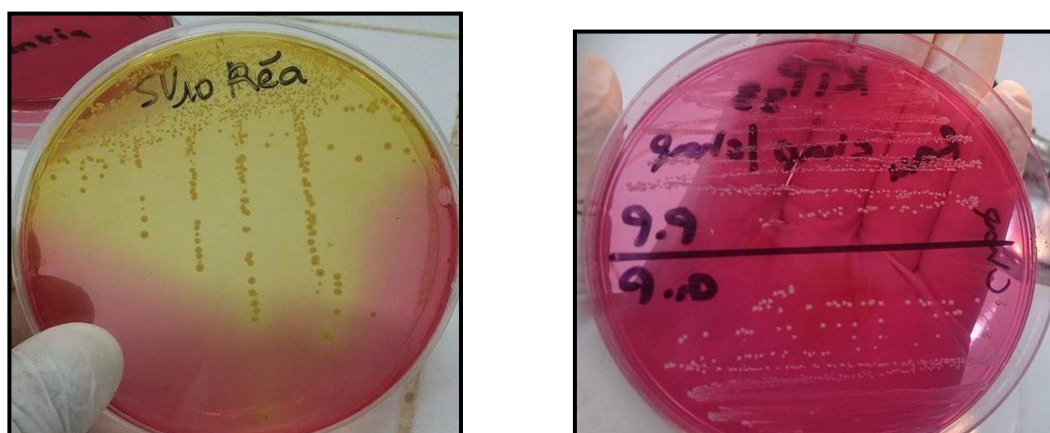


Figure 9 : Aspect des colonies de *staphylococcus* sur milieu de culture de Chapman.

2.1.2.Coloration de Gram

La coloration de Gram des colonies isolées sur milieu Chapman, nous a permis l'observation de l'aspect des colonies isolées, sous forme de cocci oeganis es en amas (grappe de raisin) ou en diplocoques(Figure 10).

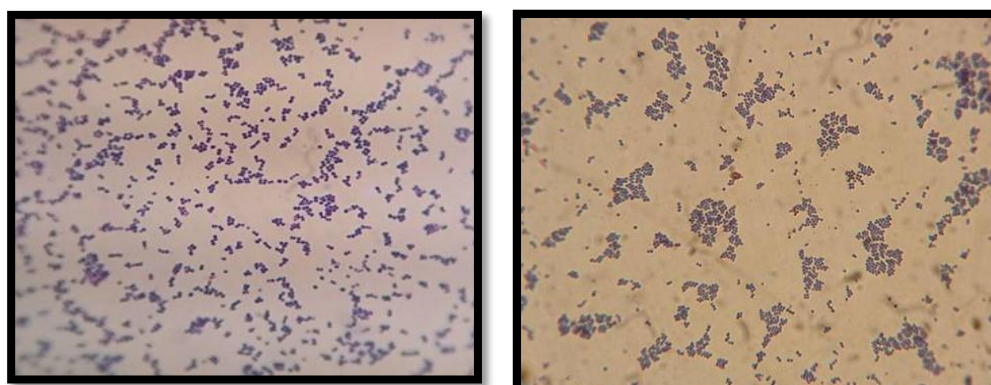


Figure 10:Coloration de Gram et observations microscopiques des souches de *Staphylocoques* grossissement x100.

2.1.3. Test catalase

La mise en évidence du catalase a révélé la présence de cet enzyme dans la majorité des germes à Gram positif, isolés sur le milieu de culture de Chapman.



Figure 11 : La mise en évidence de la production du catalase chez les cocci à Gram positif.

2.1.4. Test coagulase

La mise en évidence du coagulase est une réaction clé dans l'identification des bactéries appartenant au genre de *Staphylococcus*. Les souches de *staphylocoques aureus* isolées ont manifesté une réaction positive quant à la présence du coagulase, cependant, les souches de *staphylococcus sp* ont une coagulase négative.

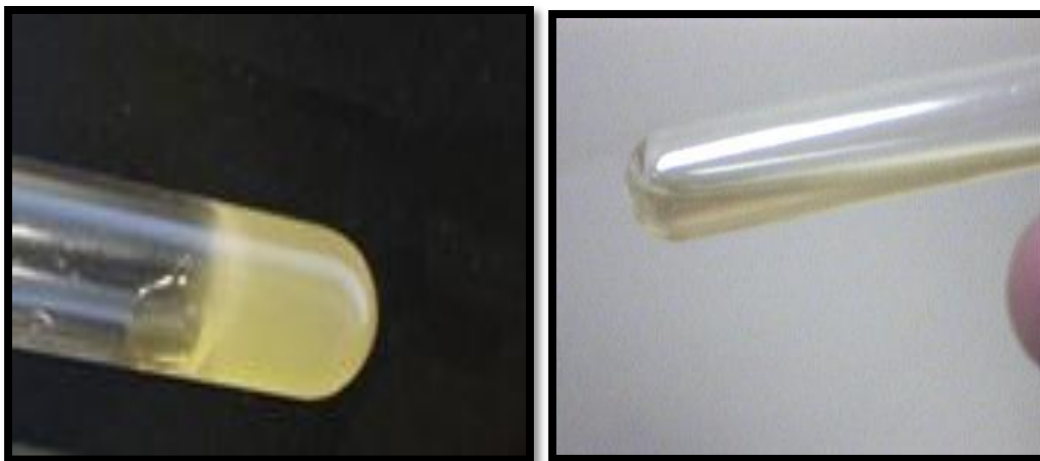


Figure 12 : La mise en évidence de la présence coagulase chez *Staphylococcus aureus*

2.1.5. Répartition des souches

L'étude de la répartition de *Staphylococcus* a montré l'isolement de 7 de cocci (50%), à Gram positif, immobiles, aéro-anaérobies facultatives, avec une catalase positive, une coagulase de cocci, ce qui explique leur appartenance à l'espèce *Staphylococcus aureus* et 7 cocci (50%) de *Staphylocoques* à coagulase négative (**Figure 19**).

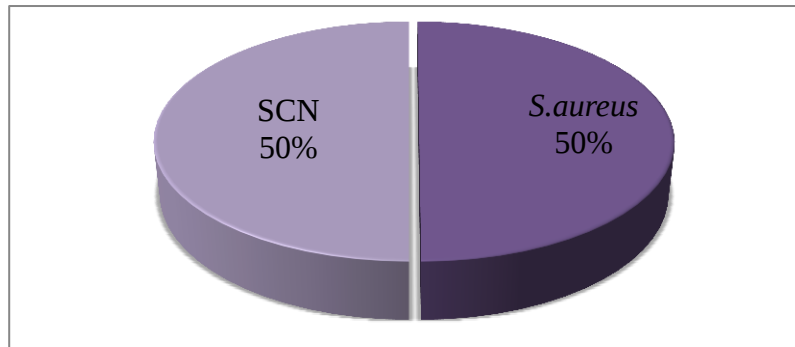


Figure 13 : Répartition des isolats de *Staphylococcus* selon la coagulase.

2.2. Identification des entérobactéries et répartition

2.2.1. Examen macroscopique et microscopique

L'ensemencement des entérobactéries sur le milieu de Hektoen, l'incubation à une température de 37°C pendant 24 heures, et l'observation macroscopique a montré la présence de colonies caractéristiques fermentant les sucres présent dans le milieu (lactose, saccharose, salicine) et apparaissent habituellement lisses, brillantes, de couleur "saumon". Cependant, leur culture sur le milieu de culture Mac Conkey donne des colonies lisses, brillantes et avec une couleur violette.

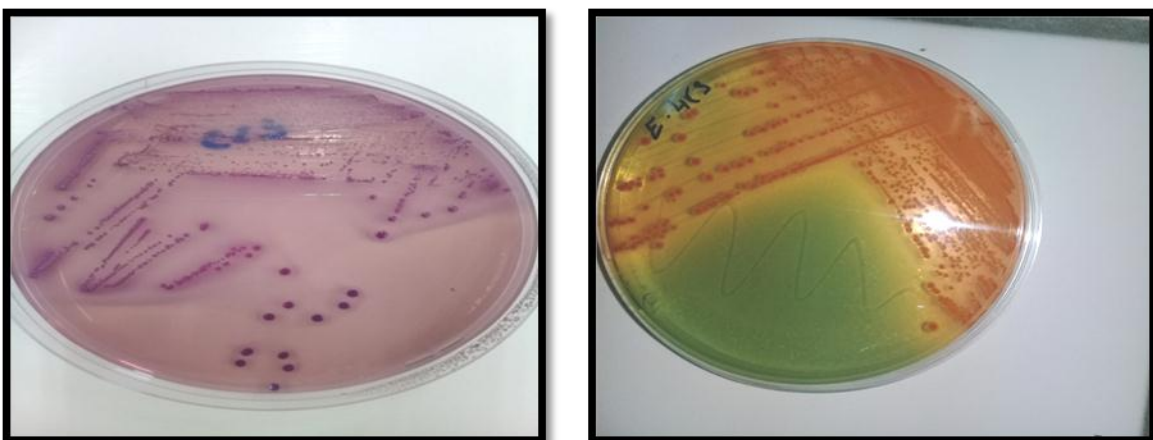


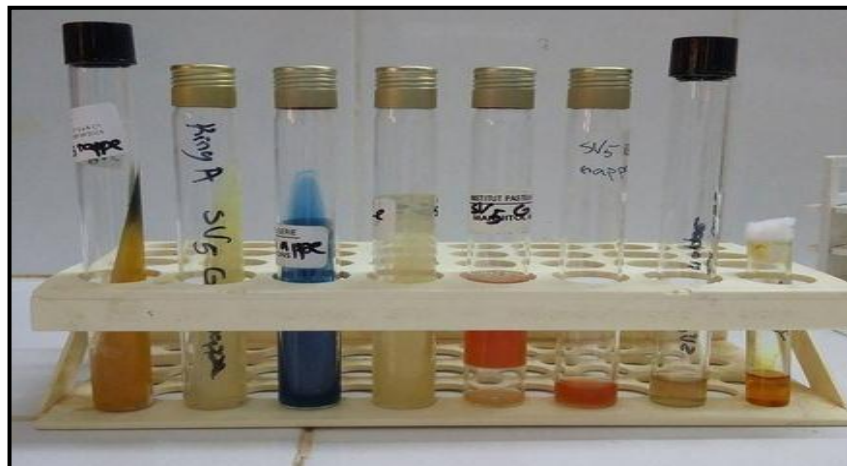
Figure 14 : Aspect macroscopique des entérobactéries ensemencées sur milieu de culture Mac Conkey et Hektoen.



Figure 15:Coloration de Gram et l'Observation microscopique (Grossissement X100) des souches isolées d'*E.coli*.

2.2.2. Identification des entérobactéries par l'utilisation de la galerie biochimique classique

L'utilisation de la biochimique galerie classique permis l'identification des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella.sp*, *Proteus.sp*, *Morganella.sp*, *Providencia.sp*, *Entérobacter.sp*, *Serratia.sp*, *Citrobacter.sp*) par la mise en évidence de ceterians caractères biochimique tels que la production d'indole, réaction de



rouge de méthyl, prduction de l'acétoine, l'utlilation de citrate, TSI, mannitol mobilité.

Figure 16 :La mise en évidence de la galerie biochimiques classiques.

2.2.3.Identification des entérobactéries par galerie API20E

L'identification des entérobactéries isolées, est procédée par l'utilisation de la galerie API 20 E

La figure 17 illustre les résultats obtenus.



Figure 17 : Aspect des galeries API 20E des souches *Escherichia coli* (5142500), *Klebsiella pneumoniae* (5315773) et *Proteus mirabilis* (0726002).

2.2.4. Répartition des entérobactéries selon genre

La Répartition des entérobactéries selon les genres isolés, à partir de service de réanimation de l'hôpital Mohamed Boudiaf de Ouargla identifié a montré l'isolement de 63 souches appartenant à la famille d'entérobactéries, avec la dominance du genre de *Escherichia. Sp* (38.09%), suivi par *Klebsiella. Sp* (33.33%), *Proteus. Sp* (9,52%) *Enterobacter. Sp*, *Morganella.sp* et *Serratia. Sp* (4.76%) *Providencia. Sp* (3.17%) et 1,53% pour *Citrobacter. Sp*. respectivement (**Figure 18**).

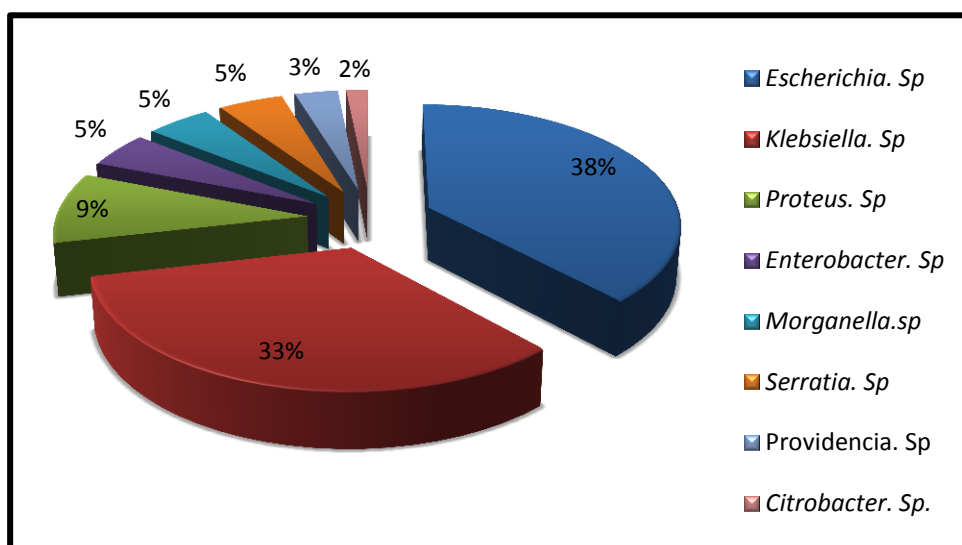


Figure 18 : Répartition des souches d'entérobactéries selon le genre.

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

3.1. Etude de la sensibilité des souches de Staphylocoques

Sur l'ensemble des souches de *Staphylococcus* isolées, caractérisées, (85%) de souches ont manifesté une importante résistance vis-à-vis de la pénicilline, (50%) de souches résistantes à l'oxacilline et (28%) de souches à vancomycine (**Figure 19**).

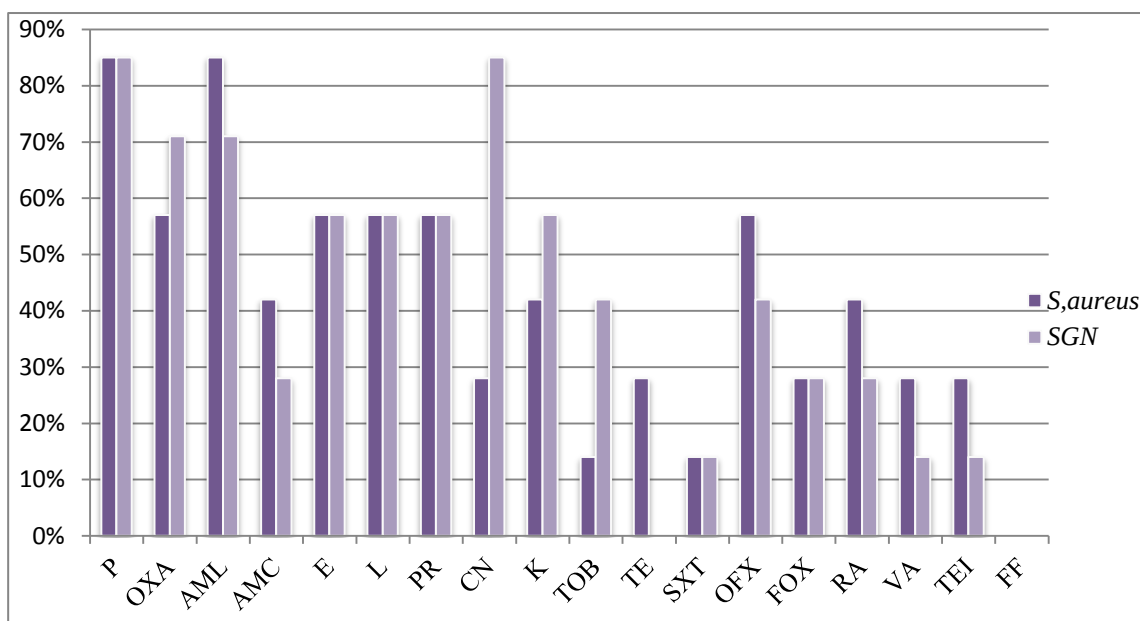


Figure 19 : Taux de résistance de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus* à coagulase négative.

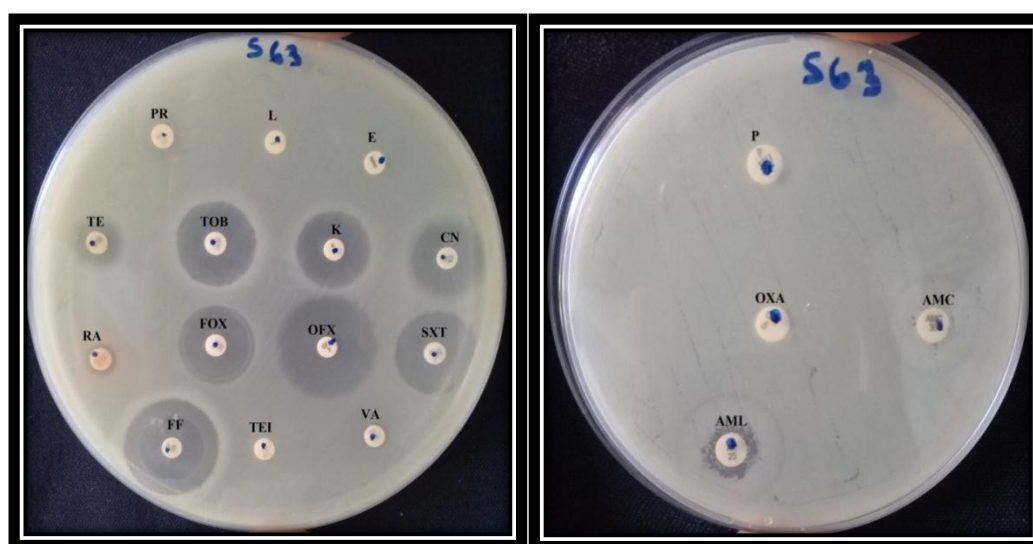


Figure 20 :Antibiogramme de *staphylococcus aureus* (Staph. 63), isolée à partir des sécrétions pulmonaires.

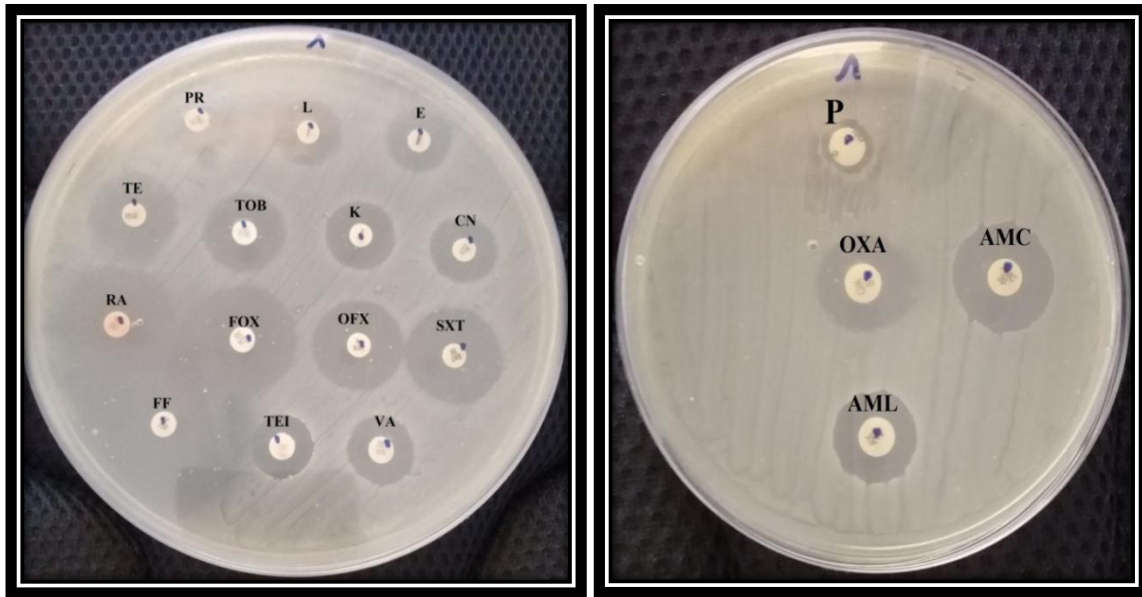


Figure 21 : AntibioGramme de *Staphylococcus* à couagulase négative (Staph. 1), isolée à partir des sécrétions pulmonaires.

3.1.1. Test de méthicilino-résistance

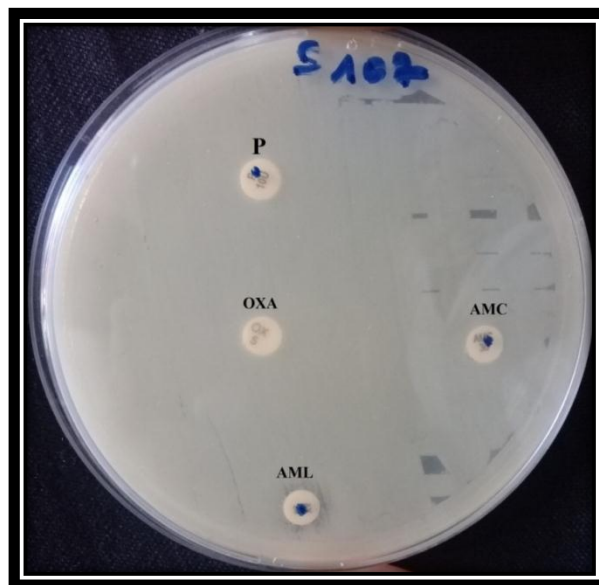


Figure 22 : Détection de la méticillino-résistance de *S. aureus* (Staph.107), isolée à partir de d'un cathéter veineux périphérique.

Sur les 7 souches de *S.aureus* isolées, identifiées, le test de diffusion du disque d'Oxacilline a permis l'exploration de 4 souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (résistantes à l'oxacilline)(Figure 22).

L'histogramme I (Figure 23) illustre le caractère de résistance des souches de *S. aureus* à la méticilline (SARM), accompagné avec une résistance croisée aux β -lactamines.

La totalité des SARM isolées sont résistantes à la pénicilline, amoxicilline et amoxicilline +acide clavulanic. Cependant, les souches isolées ont manifesté une faible résistance vis-à-vis de céfoxitine, tetracycline et triméthoprim. Par ailleurs, les souches ont montré un taux de résistance de 50% vis-à-vis de la gentamicine et kanamycine échappent totalement à l'action des aminoglycosides.

En outre, les souches isolées ont présenté également un taux de résistance de 75%. vis-à-vis de l'érythromycine le lincomycine et la pristnamycine et un taux de sensibilité à la rifampicine supérieur à 70%. Par ailleurs, 50% des souches isolées ont manifesté un taux de résistance à la vancomycine très élevé.

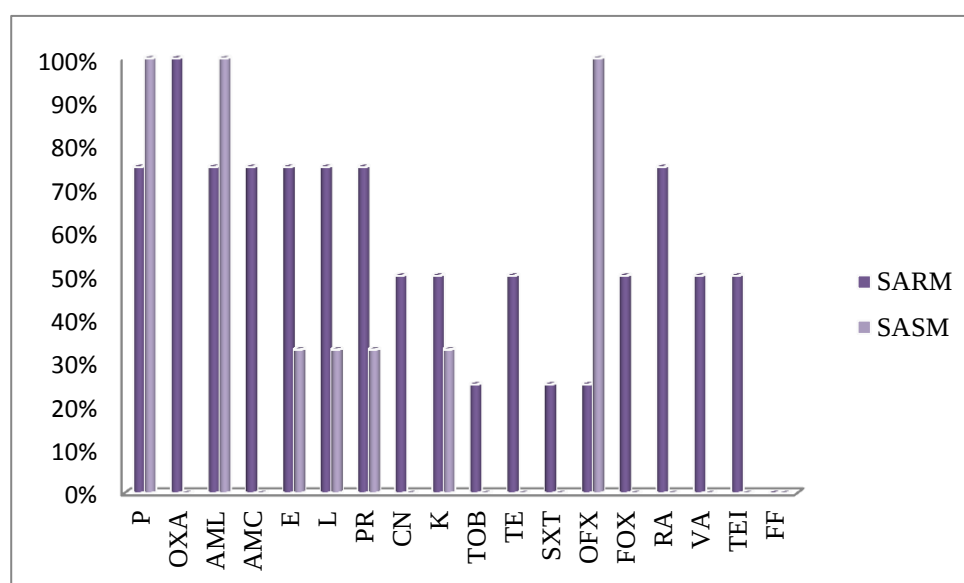


Figure 23: Taux de résistance et de sensibilité de *Staphylococcus aureus* à la méthicilline.

3.1.2. Staphylocoques et Aminoglycosides

L'interprétation de l'antibiogramme a révélé la détection de trois phénotypes de résistance aux aminoglycosides, avec une prédominance du phénotype K (50%), expliquée par la présence d'une enzyme aminoglycoside phosphotransférase (3')-III (l'APH (3')-III), induisant la perte la synergie avec l'amikacine. Le phénotype KT et KTG intervenant avec un pourcentage de 29%.

Tableau 2 : Détermination de phénotype de résistance aux aminosides.

Phénotype	Enzyme	kanamycine	Tobramycine	Gentamycine	Nombre	Pourcentage
K	APH (3')-III	R	S	S	07	50%
KT	ANT-(4')-(4'')	R	R	S	04	29%
KTG	AAC (6')-APH 2 ''	R	R	R	04	29%

3.1.3. Staphylocoques et Macrolides

Les souches des *staphylococcus* isolées ont montré une importante résistance aux macrolides, avec un phénotype constitutif et un taux de résistance de (50%).

Tableau 3 : Détermination de phénotype de résistance aux macrolides.

Génotype	phénotype	E	L	PR	Pourcentage%
Erm	Inductible	R	S	S	0%
Erm	Constitutif	R	R	R	50%

Vancomycine

La vancomycine représente actuellement l'un des meilleurs antibiotiques vis-à-vis des infections à *S. aureus* résistantes à la méticilline, cependant, l'utilisation systématique, a conduit à l'émergence de souches *S. aureus* avec des sensibilités diminuées aux glycopeptides (GISA).

L'antibiogramme a révélé que 3 souches se distinguaient par leur résistance à la vancomycine. Ces souches (Sa1, Sa2, Sa3) sont isolées à partir de sécrétion pulmonaire, de cathéter veineux périphérique et de sonde d'aspiration respectivement.

3.2. Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux β -lactamines

Les souches d'entérobactéries isolées ont manifesté une importance résistance vis-à-vis des antibiotiques testés. La totalité des souches isolées (100%) ont montré une résistance vis-à-vis de l'amoxicilline et la céfalotine. Les taux de résistance aux C3G (CTX, CAZ) sont de l'ordre (56% et 49%), l'Imipinème reste relativement l'antibiotique efficace contre les entérobactéries isolées, avec un taux de résistance de 0.5%.

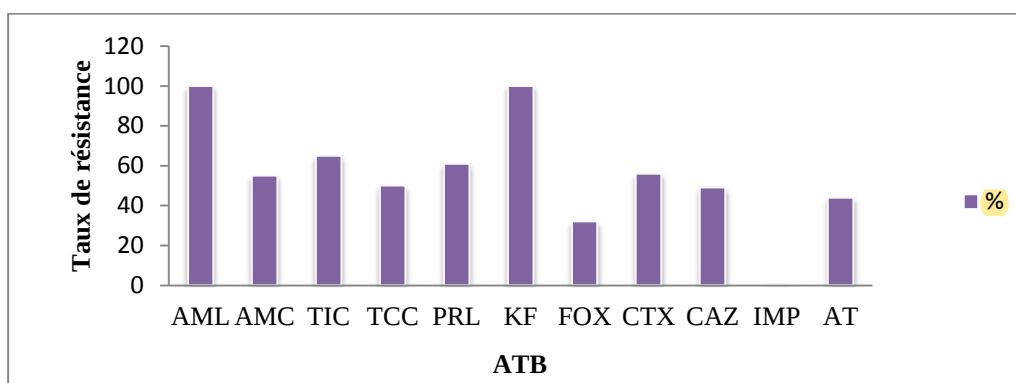


Figure 24 : Taux de résistance des souches aux β -lactamines.

3.2.1. Phénotypes de résistance aux β -lactamines

L'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches isolées a montré une dominance du phénotype de production de céphalosporinase (CASE) avec 24 souches, soit 36%. Le phénotype de production de β -lactamases à spectre étendu avec la production des céphalosporinases (CASE+BLSE) est observé chez 16 souches, soit 27%. Le phénotype de production de pénicillinase (PASE) induisant une résistance aux pénicillines testées, vient en troisième position avec 13 souches, soit 20%, suivi de phénotype de production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) avec 10 souches, soit 17%.

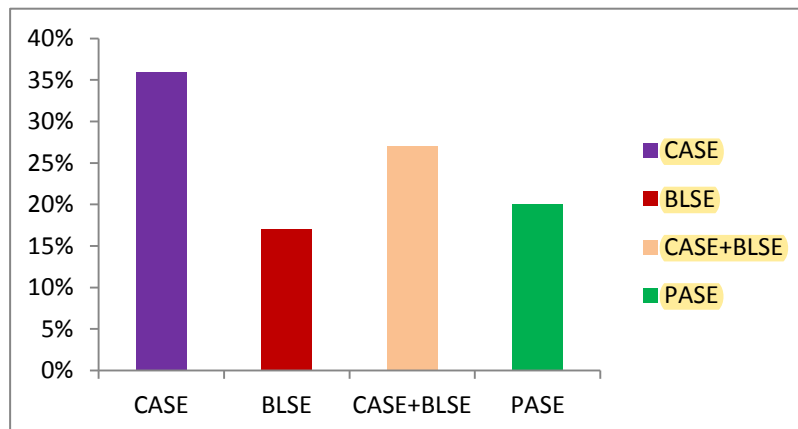


Figure 25 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines.

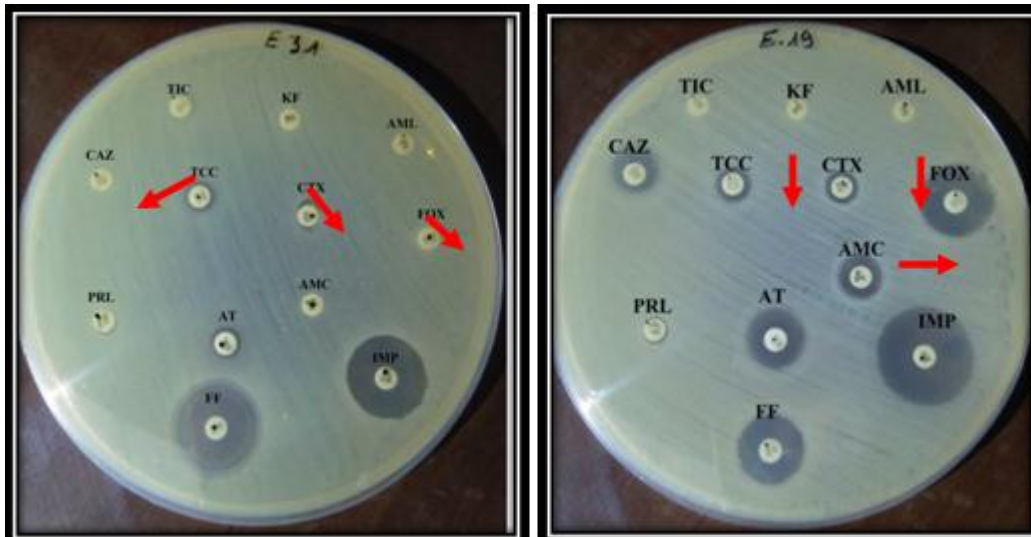


Figure 26: Détermination de phénotype CASE et (CASE+ BLSE)

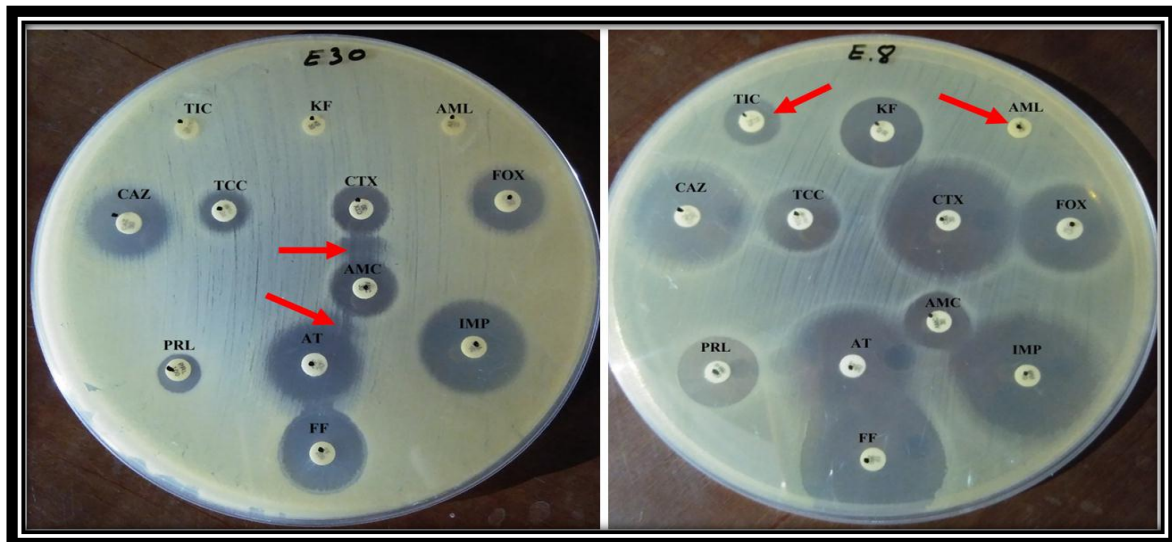


Figure 27: Détermination de phénotype BLSE et (PASE).

3.2.2. Résistance associée

Les résistances aux aminosides (gentamicine, tobramycine et amikacine), sont fréquentes chez les souches isolées, produisant des céphalosporinase. Des taux de résistance élevés aux quinolones (ciprofloxacine) (83%) sont observés chez les souches présentant le phénotype CASE.

Des taux de résistances à l'amikacine diminuées sont notés chez tous les phénotypes (BLSE (0%), PASE (0%), CASE (0%) et CASE+BLSE (0%).

Par ailleurs, des taux de résistances à la colistine, sont obtenus chez les souches les phénotypes BLSE, PASE et CASE+BLSE. En conclusion, cette étroite association entre la

production de β -lactamases et la résistance aux autres antibiotiques, représente un grand risque d'échec thérapeutique.

Tableau 4 : Résistance des entérobactéries en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Phénotype (n)	CN	TOB	AK	CIP	CT
BLSE (10)	5(45%)	01(9%)	0(0%)	06(55%)	11(100%)
CASE+BLSE (16)	8(50%)	00(0%)	0(0%)	07(44%)	16(100%)
CASE (24)	14 (58%)	7(29%)	0(0%)	20(83%)	23(96%)
PASE (13)	0(0%)	1(8%)	0(0%)	04(31%)	13(100%)

II. Bactéries lactiques

1. Isolement des bactéries lactiques du lait cru et des produits laitiers fermentés traditionnels

L'analyse des laits (chèvre et chamelle) et produits laitiers fermentés traditionnels (Jben et Kemaria) a permis l'isolement de 200 souches sur le milieu de culture gélosé MRS ou M17.

La coloration de Gram, l'observation morphologique macroscopique et microscopique, et la mise en évidence de la réaction du catalase ont montré la présence des cocci ou des bacilles à Gram positif et catalase négative, critères caractéristiques des bactéries lactiques.

2. Purification et identification des genres

2.1. Aspect macroscopique

La caractérisation macroscopique, a permis la description de l'aspect des colonies obtenues sur milieu de culture solide de MRS et M17, ajusté à une valeur de pH, incubées à une température de 30°C pendant 72 heures (**florez et al., 2006**) et la détermination des critères des bactéries lactiques telles que la taille, la pigmentation, le contour, l'aspect, la viscosité. Les colonies obtenues sur milieu de culture solide apparaissent de petites colonies d'un diamètre de 1 mm, de forme lenticulaire de couleurs blanchâtres ou laiteuses, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier (**Figure 28**).

La croissance sur milieu de culture MRS liquide est caractérisée par l'apparition du trouble au fond du tube avec une zone transparente à la surface du milieu de culture liquide (**Figure 29**).



Figure 28: Aspect lenticulaires de couleur blanche des colonies des bactéries lactiques, isolées sur milieu de culture MRS.

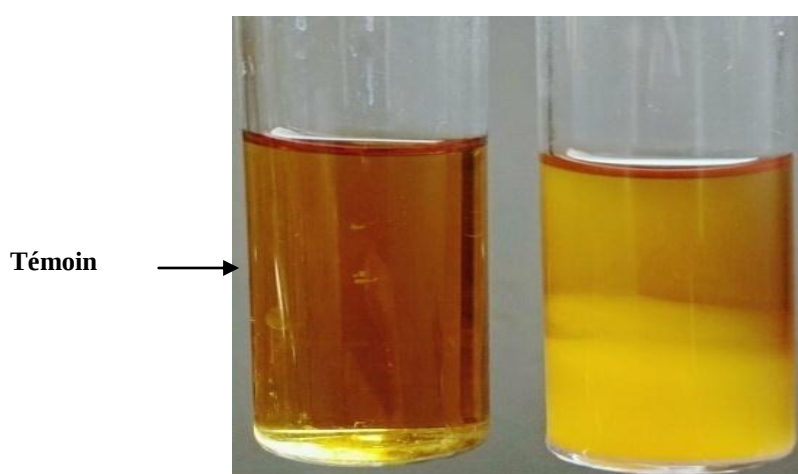


Figure 29: Aspect microaérophiles des cultures pures des bactéries lactiques, isolées sur milieu de culture MRS liquide.

2.2. Aspect microscopique

La coloration de Gram et l'observation microscopique ont permis de différencier les bacilles longs, organisés en chainettes et de cocci en amas ou en chainettes.

La mise en évidence de la présence du catalase a manifesté l'absence de cet enzyme chez les bactéries lactiques; ce qui explique l'incapacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène.

Les bactéries sélectionnées lactiques sont des bactéries à Gram positifs, non sporulées une forme cellulaire de cocci avec une réaction de la catalase négative et un mode d'association variable (**Figure 30**)(Joffin et Leyral,1996).

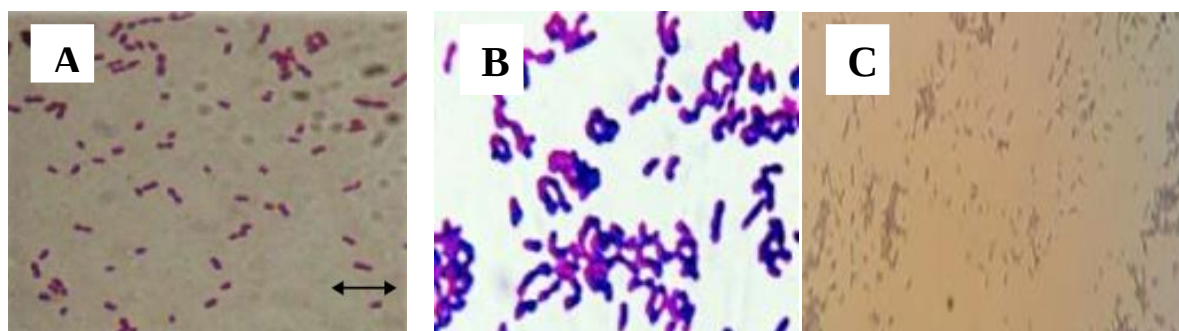


Figure 30: La coloration de Gram et l'observation microscopique des bactéries lactiques, isolées, sélectionnées LAB20 (A), LAB16 (B) et LAB50 (C).

3. Type fermentaire -

L'étude du type fermentaire constitue la clé d'identification phénotypique des bactéries lactiques, réalisé sur milieu de culture glucosé, contenant une cloche de Durham, a permis la différenciation entre les isolats homofermentaires et hétérofermentaires.

La présence de gaz dans la cloche de Durham a montré un métabolisme hétérofermentaire. A cet effet, les deux cent bactéries lactiques isolées, sélectionnées ont manifesté les deux types de fermentation homo-fermentaires et hétéro-fermentaires (**Figure 31**).

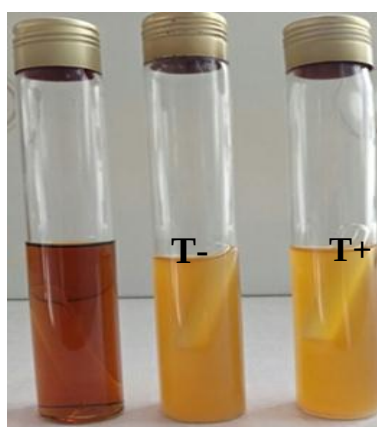


Figure 31: Illustration du type fermentaire d'une souche isolée sur milieu de culture de MRS glucosé, *Lactobacillus sp* et *Leuconostoc mesenteroides* sont des souches témoins utilisées.

4. Criblage des souches antagonistes

L'activité antagoniste des 200 souches isolées sélectionnées est mise en évidence vis-à-vis de *Escherichia coli* ATCC25992, *Salmonella typhi* ATCC14028, *Klebsiella pneumonia* (KP72), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Acinetobacter baumannii* (AB3), *Staphylococcus aureus* résistant à la Methicilline (MRSA9), *Streptococcus pneumonia* (SP421),

Enterococcus faecalis (EF32). Les pré-cultures de bactéries lactiques isolées, sélectionnées antagonistes et les souches pathogènes multirésistantes sont inoculées dans un milieu de culture liquide de MRS et dans un bouillon nutritif respectivement. L'activité antagoniste est effectuée sur milieu de culture gélosé de Mueller-Hinton selon la technique indirecte décrite par Barefoot *et al.*, (1983)

Les résultats obtenus ont montré que 9.5 % des bactéries lactiques isolées, sélectionnées ont manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de souches cliniques hospitalières multi-résistantes: *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Acinetobacter baumannii* (AB3), *Staphylococcus aureus* résistant à la Methicilline (MRSA9), *Streptococcus pneumonia* (SP421), *Enterococcus faecalis* (EF32). A l'opposé, 90.5% des bactéries lactiques isolées, sélectionnées ont présenté une faible activité antagoniste.

Les zones d'inhibitions formées autour des colonies, apparaissent claires avec des diamètres de zones d'inhibitions variables de 08 et 26 mm (**Figure 32, Tableau 5**).

L'étude de l'activité antagoniste des bactéries lactiques isolées, sélectionnées (LAB1, LAB2, LAB3, LAB4, LAB5, LAB6, LAB7, LAB8, LAB9, LAB10, LAB11, LAB11, LAB12, LAB13, LAB14, LAB15, LAB16, LAB17, LAB18, LAB19) est mise en évidence vis-à-vis de souches pathogènes sélectionnées multirésistantes.

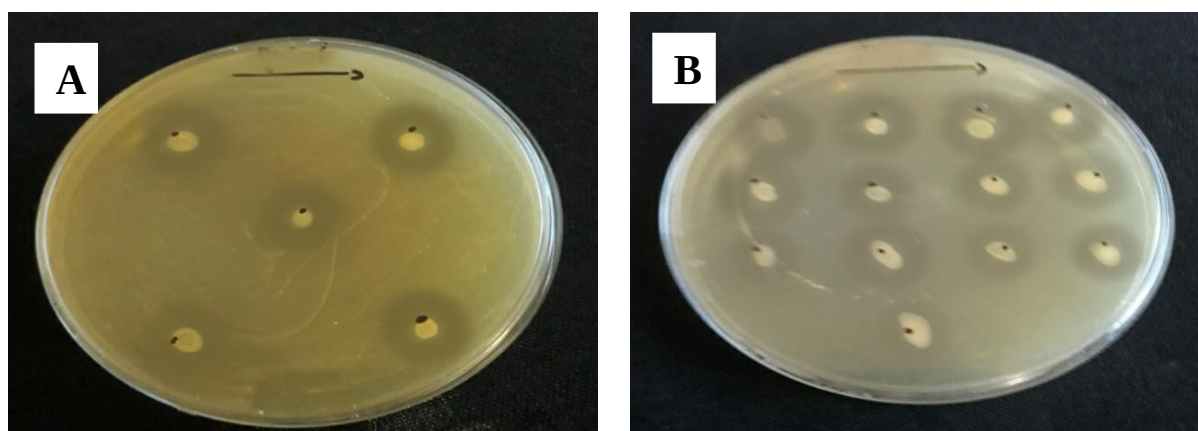


Figure 32 : L'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées vis-à-vis de bactéries pathogènes de *S.typhi* ATCC14028 (A) et *S. aureus* MRSA9 (B) par méthode de diffusion sur gélose, inoculées sur le milieu de culture solide MRS, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures.

Tableau5 :Illustration de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques antagonistes isolées (LAB1, LAB2. LAB3, LAB4, LAB5, LAB6, LAB7, LAB8, LAB9, LAB10, LAB11, LAB11, LAB12, LAB13, LAB14, LAB15, LAB16, LAB17,LAB18,LAB19) vis-à-vis de souches pathogènes *E.coli* ATCC25992 , *S. typhi* ATCC14028, KP7, PA, AB3, MRSA9, SP421, EF 32.

Bactéries isolées LAB	Code	Effet inhibiteur des bactéries lactiques antagonistes isolées vis-à-vis des bactéries pathogènes							
		<i>E.coli</i> ATCC25992	<i>S. typhi</i> ATCC14028	KP72	PA	AB3	MRSA9	SP421	EF 32
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB1	20	12	13	20	11	19	15	18
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB2	20	09	00	22	00	21	10	20
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB3	13	00	00	17	00	18	25	12
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB4	12	10	08	14	10	14	11	14
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB5	22	00	10	21	11	16	13	15
<i>Lactococcus lactis</i>	LAB6	12	00	00	12	10	20	13	14
<i>Lactococcus lactis</i>	LAB7	18	00	10	14	11	14	10	12
<i>Lactococcus lactis</i>	LAB 8	20	00	12	15	11	20	12	11
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	LAB 9	20	23	18	15	09	20	17	26
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	LAB 10	12	00	10	18	14	18	12	14
<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	LAB 11	21	10	17	20	12	20	11	13
<i>L. mesenteroide subsp crémoris</i>	LAB 12	15	08	13	20	11	21	20	16
<i>L. mesenteroide subsp crémoris</i>	LAB 13	14	20	11	26	10	21	12	12
<i>Leuconostoc lactis</i>	LAB 14	15	00	00	10	08	11	10	12
<i>Leuconostoc sp</i>	LAB 15	17	00	14	19	00	16	19	11
<i>Entérocooccus durans</i>	LAB 16	20	00	00	14	14	22	17	12
<i>Entérocooccus durans</i>	LAB 17	14	00	00	13	00	22	15	17
<i>Entérocooccus durans</i>	LAB18	17	10	18	20	11	22	20	18
<i>Weissella sp</i>	LAB 19	12	00	00	11	00	18	10	10

Les bactériocines des LAB ont montré une importante activité antagoniste vis-à-vis de germes pathogènes MDR, ce qui explique la possibilité d'utilisation des bactériocines dans le traitement des patients hospitalisés et communautaires. **(Perez et al., 2014).**

Biswas et ses collaborateurs (2017) ont rapporté que 13% des bactéries lactiques isolées (11 isolats sur 84) ont manifesté une importante activité productrice de bactériocine.

Cependant, **Zergoug et ses collaborateurs (2016)** ont montré que rapporté que 10 souches des 40 LAB isolés à partir de lait cru de chèvre ont révélé une importante activité inhibitrice vis-à-vis de germes uropathogènes. Par ailleurs, **Sezer et Güven (2009)** ont montré que 35 bactéries lactiques isolées à partir de lait et des produits carnés ont présenté une activité inhibitrice parmi 12700 souches bactériennes. **Mezaini et ses collaborateurs (2009)** ont rapporté sur la sélection de 6 bactéries lactiques inhibitrices de la croissance de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

Les (19) dix neuf isolats ont manifesté une importante activité inhibitrice vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC25992, *Salmonella typhi* ATCC14028, *Klebsiella pneumonia* (KP72), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Acinetobacter baumannii* (AB3), *Staphylococcus aureus* résistante à la Methicilline (MRSA9), *Streptococcus pneumonia* (SP421), *Enterococcus faecalis* (EF32), ce qui corrobore avec travaux antérieurs rapportés par **(Mohankumar 2011; Rapsang et al., 2011, 2013).**

Les études antérieures rapportés par **Makras et al., (2006)** ont montré une importante activité antagoniste de bactérie lactiques vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* **Nigatu et al., (2015).**

Par ailleurs, **Yateem et al. (2008)** ont rapporté l'isolement de bactéries lactiques à partir du lait de chamelle au Kuwait et leur l'effet antagoniste exercé uniquement sur les bactéries à Gram négatif (*Salmonella ssp* et *E. coli*).

A l'opposé, **Ammor et al., (2006)** ont isolé des lactiques et leur effet antagoniste est restreint aux bactéries à Gram positif. La croissance des bactéries à Gram négatif en présence de bactéries lactiques antagonistes peut être due principalement à la présence d'une membrane externe, empêchant les bactériocines à d'atteindre la membrane interne **(Dortu et Thonart, 2008).**

L'activité antagoniste des bactéries lactiques isolées vis-à-vis de la croissance de bactéries BMR a montré que parmi les 19 isolats, deux souches bactériennes (*Lactococcus raffinolactis* LAB9 et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13) ont manifesté une importante inhibitrice vis-à-vis de de diverses bactéries Gram-positives et négatives.

Mokdad et coll. (2020) ont rapporté que *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a montré une importante activité inhibitrice vis-à-vis de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *S. aureus*, *B. thermosphacta*, *M. luteus*, *L. sakei*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

Des travaux antérieurs rapportés par (**Asahina et al., 2012; Arakawa et al., 2016; Bellil et al., 2018**) ont rapporté l'activité inhibitrice des bactériocine produite par *L. mesenteroides* contre d'autres pathogènes Gram-positifs, (*B. thermosphacta*, *S. aureus*, *M. luteus*) et les bactéries à Gram-négatifs (*E. coli* et *P. aeruginosa*).

Les bactéries lactiques inhibent des germes pathogènes à Gram positif par le mécanisme de formation des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires (**Biswas et al., 1991**).

A l'opposé, peu de travaux sont publiés sur l'activité inhibitrice des bactériocines contre les bactéries Gram négatives, des champignons ou des levures (**Todorov et al., 2007 ; Hassan et Bullerman, 2008 ; Gerez et al., 2009 ; Altuntas et al., 2010 ; Smaoui et al., 2010**).

Biswas et ses collaborateurs (2017) ont rapporté l'amélioration de l'activité antimicrobienne des bactériocines vis-à-vis de bactéries Gram négatives lors de la combinaison des bactériocines avec des antibiotiques, telles que le céfotaxime, la polymyxine B, l'imipénem et la tigécycline.

De même, les traitements avec de la nisine, additionnée d'EDTA à 0,1 et 1 mM, d'acide citrique et d'acide lactique ont augmenté la perméabilité des bactéries : *E coli*, *P. aeruginosa*, *P. marginalis*, et *S. enterica* sv. *typhimurium* (**Helander et Mattila- Sandholm, 2000**).

L'objectif de ce présent travail est l'isolement et le criblage d'une large gamme de bactéries lactiques autochtones isolées à partir de lait cru (chameau et chèvre) et des produits laitiers fermentés traditionnels (Jben et kamaria) du sud algérien et l'étude de leur activité antagoniste vis-à-vis de bactérie à Gram-Positive et responsables d'infections nosocomiales.

Les bactéries à Gram positif et négatif isolées à partir de milieu hospitalier se manifestent très sensibles aux bactériocines ainsi que les bactéries à Gram.

5. Identification des espèces des souches sélectionnées

Identification par la galerie API CHL 50

La galerie API CHL 50 est utilisée pour l'identification des deux bactéries lactiques isolées, sélectionnées fortement antagonistes (LAB 9 et LAB13). Les résultats obtenus de la fermentation des hydrates de carbone, ont permis l'identification des espèces (**Tableau 5**).

La comparaison des résultats obtenus avec les données décrites par **Carr et al.,(2002)**, **Axelsson (2004)** et **Hammes et Hertel (2006)** a permis de classer les deux espèces.

Les résultats ont montré l'appartenance de la souche LAB9 à l'espèce *Lactococcus raffinolactis*, cependant la souche LAB 13 à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* subsp.cremoris.

Tableau 6 : Présentation des caractéristiques biochimiques des souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB 9 et LAB13) lors de l'utilisation de la galerie API CHL50.

hydrates de carbone	LAB9	LAB13
Témoin	-	-
Glycérol	-	-
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	+
L-Arabinose	+	+
D-Ribose	+	+
D-Xylose	-	-
L-Xylose	-	-
D-Adonitol	-	-
MDX	-	+
D-Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	-
L-Sorbose	-	+
L-Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
D-Mannitol	+	-
D-Sorbitol	+	-
MDM	+	-
MDG	-	+
NAG	+	-
Amydaline	+	-
Arbutine	+	+
ESC	+	-
Salicine	+	+
D-Celiobiose	+	-
D-Maltose	+	-
D- Lactose ¹	+	-
D-Melibiose	+	-
D-Saccharose	+	+
D-Trehalose	+	-
Inuline	-	-
D-Mélézitose	+	-
D-Raffinose	+	-
Amidon	-	-

Glycogène	-	-
Xylitol	-	-
Gentiobiose	+	-
D-Turanose	+	-
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	-	+
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
GNT	+	-
2KG	-	-
5KG	-	-
Identifiée comme	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>



Figure33:Profil fermentaire de la souche LAB 13, identifiée par lagalerie API 50 CHL.

6. AntibioGramme des souches lactiques

L'étude de l'antibiorésistance chez les bactéries lactiques constitue un critère important du potentiel probiotique des souches lactiques. En effet, la sensibilité des bactéries lactiques isolées aux antibiotiques (ATB), notamment à large spectre d'action, constitue un critère de bactérie probiotique.

L'une des principales propriétés d'une bactérie probiotique est leur incapacité de transférer la résistance aux ATB à des bactéries de leur l'écosystème. 19 souches de bactéries lactiques isolées, sélectionnées antagonistes sont testées vis-à-vis de leur résistance aux antibiotiques (**Tableau 7**).

Tableau 7 : L'antibiogramme des bactéries lactiques isolées, sélectionnées, antagonistes (LAB 9 et LAB13).

	Les antibiotiques	LAB9	LAB13
Béta-lactamines	Pénicilline G (P 10)	S	S
	Oxacilline (OX 1)	R	R
	Ticarcilline (TI75)	S	S
	Amoxicilline (AML 30)	S	S
	Amoxicilline/Acide clavulanique (AMC 30)	S	S
	Céfalexine (CN 10)	R	R
	Céfoxitine (FOX 30)	R	R
	Céfotaxime (CTX 30)	S	S
	Céftazidime (CAZ 30)	S	S
Amino-sides	Amikacine (AK 30)	R	R
	Kanamycine (K 30)	R	R
	Streptomycine (S 10)	R	R
Macrolides	Erythromycine (E 15)	S	S
	Clindamycine (CD 2)	S	S
	Lincomycine (L 2)	S	S
	Acide fusidique (FC 10)	S	S
	Tétracycline (TE 30)	S	S
	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (SXT 25)	R	R
	Rifampicine (RD 30)	S	S

R : résistante, S : sensible.

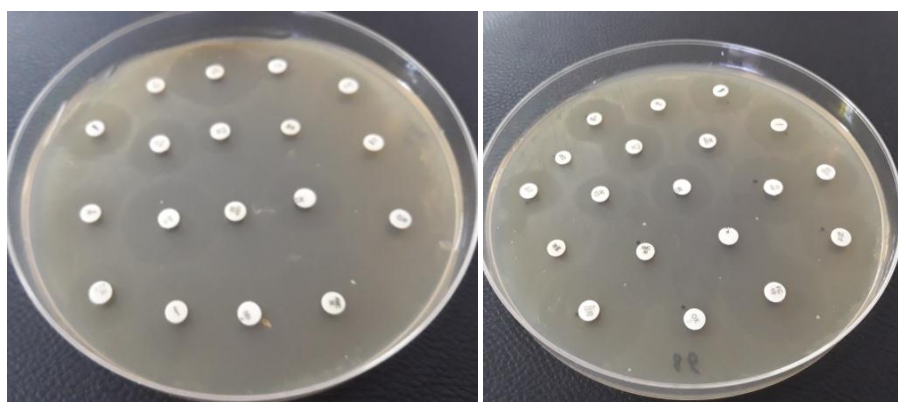


Figure 34 : Antibiogramme de la souche LAB9 etLAB13.

Les résultats obtenus ont montré que les deux souches LAB9 et LAB13 se manifestent résistantes à la céfazoline, au céfotaxime, à l'oxacilline et à la vancomycine (**Tableau 7**).

Cependant, La résistance de *Leuconostoc mesenteroides* à la vancomycine est due principalement à la présence d'un pentapeptide avec un D -lactate C-terminal au lieu d'un D-Ala dans le peptidoglycane (**Delcour et al., 1999**).

Cependant, la Résistance *Leuconostoc spp* à la vancomycine est naturelle et non acquise par transfert de gène (**Salminen et al.,1998**).

Des travaux antérieurs réalisés par **Hummel et al., (2007)** ont rapporté la détermination des profils de résistance phénotypique. La résistance de *Leuconostoc* est intrinsèque, généralement considérée comme non transférables. Selon l'Autorité européenne de sécurité des aliments, l'utilisation de la bactérie *Leuconostoc* dans la production de produits laitiers (et autres) représente un faible potentiel de propagation de gènes codant des résistances.

7. Caractérisation de l'agent antagoniste

La caractérisation de l'agent responsable de l'activité antagoniste des bactéries lactiques isolées (LAB9 et LAB13) est effectuée lors de l'optimisation des différents facteurs tels que l'effet du pH, la température et l'effet des agents chimiques.

7.1. Détermination de la thermorésistance

Le traitement du surnageant à différentes températures (60, 70, 90, 110°C) et l'exploration de leur activité antibactérienne ont montré que les souches MDR sont inhibées en présence de bactériocine traitées à une température de 100°C, ce qui explique la thermostabilité des bactériocines.

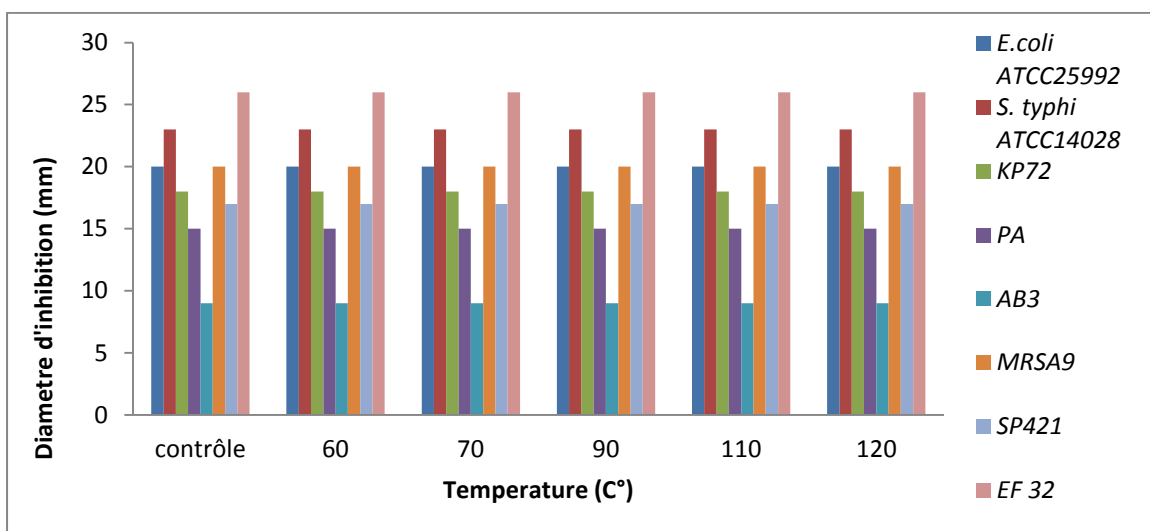


Figure 35: Effet du traitement thermique de la bactériocine, chez la souche isolée, sélectionnée LAB13.

Des travaux antérieurs réalisés par **Bellil et ses collaborateurs (2020)** ont rapporté que les substances inhibitrices des bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* sont thermostables après leur traitement à une température 80°C pendant une durée trop longue.

(Shiet *al.*, 2016 ; Dündar et *al.*, 2015) ont rapporté que la leucocin K7, la mesentericin W3 conservent leur activité inhibitrice, lors de leur traitement à une température 120°C pendant des intervalles de temps de 20, 15 min) respectivement.

Par ailleurs, les travaux antérieurs réalisés par **Maurya et *al.*, (2012)** ont rapporté que la bactériocine du filtrat de culture de *Leuconostoc* NT-1 a manifesté une légère réduction de l'activité bactériocine à une température de 80°C.

La thermorésistance de bactériocine des souches LAB9 et LAB13 suggère leur appartenance au groupe des bactériocines thermorésistantes de la classe II.

La résistance à la chaleur est une caractéristique majeure de nombreuses bactériocines et composés de type bactériocine produits chez les bactéries lactiques qui varie considérablement entre 60°C ou 100°C pendant plus de 30 minutes (par exemple, lactocine 27, lactocine S, carnobactériocines A et B) à l'autoclavage à 121°C pendant (15-20 min) (par exemple lactacine B, lactacine F, nisine, etc.) **(De Vuyst et Vandamme, 1994).**

7.2.Détermination du pH optimum

Dans le but d'explorer le pH optimum sur l'activité antagoniste du surnageant des souches isolées; sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB 13) vis-à-vis de souches pathogènes multirésistantes, le surnageant récupéré par centrifugation est ajusté à différentes valeurs de pH et l'activité antagoniste est évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions formés.

Tableau 8 : L'effet du pH sur l'activité productrices de la bactériocine chez la souche isolée sélectionnée antagoniste LAB13.

pH du milieu	Etat du milieu	Diamètre du halo l'inhibition
Témoin (pH>6)		20
pH=2	Non réajusté	20
	réajusté	23
pH=4	Non réajusté	20
	réajusté	23
pH=6	Non réajusté	20
	réajusté	23
pH=8	Non réajusté	20
	réajusté	23
pH=9	Non réajusté	20
	Réajusté	23
pH=12	Non réajusté	20
	Réajusté	23

Les diamètres des zones d'inhibition sont mentionnés en mm

D'une manière générale, l'activité inhibitrice des bactériocines produites chez les bactéries lactiques isolées, sélectionnées (LAB9 et de LAB13) reste stable à différentes valeurs de pH.

Par ailleurs, (**Bellil et al.,2019**) ont rapporté la stabilité de l'activité inhibitrice des bactériocines produites chez les bactéries lactiques isolées à différentes valeurs de pH.

En outre, **Dündar et al.,(2015)** ont rapporté la stabilité de l'activité inhibitrice de la mesentericin W3.

Des études antérieures réalisées par (**Losteinkit et al., 2001 ; Ghrairi et al., 2008;Mokdad et al.,2020 ; Maurya et al., 2012**) ont rapporté que l'activité inhibitrice des bactériocines diminuent considérablement à des valeurs de pH comprises entre (2-10).

Wulijideligen et al.,(2012) ont montré que la bactériocine produite par *L. mesenteroides* 406 possède des propriétés physico-chimiques uniques telles que la thermostabilité et leur résistance conditions acides et alcalines .

L'activité inhibitrice de nombreuses bactériocines produites chez les bactéries lactiques sont instables à des valeurs de pH acide et neutre et reduites à une valeur de pH supérieur à 8 telles que la nisine, la lactostrepcines, la pédiocine ACh, la leucocine A -UAL 187)(**De Vuyst et Vandamme, 1994**), ce qui explique la diminution de la solubilité des bactériocines avec l'augmentation du pH (**Dündar et al., 2008**).

La thermostabilité et la stabilité des bactériocines à des valeurs de pH, constituent des caractéristiques utiles pour une application dans la transformation des aliments et des

médicaments (Ahmadova *et al.*, 2013).

7.3. Effet des enzymes protéolytiques

Dans le but d'explorer la nature des bactériocines produites chez souches isolées; sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB 13), le surnageant des cultures des deux souches est traité avec des enzymes protéolytiques et de la catalase.

Les résultats obtenus ont montré que le traitement des surnageants de culture avec l'enzyme de la catalase ont révélé aucune inhibition de l'activité antagoniste des deux souches LAB9 et LAB13.

Par ailleurs, le traitement des surnageants avec les enzymes protéolytiques, a montré que l'agent inhibiteur produit chez les deux souches LAB9 et LAB13 est complètement inhibé sous l'action des enzymes protéolytique telles que la protéinase K, la pepsine et la trypsine.

L'inactivation de l'agent inhibiteur sous l'action des enzymes protéolytiques est rapportée par (Klaenhammer,1993 ; Floriano *et al.*,1998 ; Deraz *et al.*,2005 ; Kumar *et al.*,2010)

L'exploration de la nature peptidique des bactériocines produites chez la souche *Leuconostoc pseudomesenteroides*, isolée à partir de Boza, une boisson traditionnelle fermentée à base de céréales consommée en Turquie, est mise en évidence lors de l'utilisation de la la trypsine, la pepsine et la protéinase K (Makhloufi *et al.*, 2011).

Tableau 9 : L'effet du traitement enzymatique des souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB 9 et LAB13)

	Surnageant	Catalase	Enzymes Proteolytiques
Control	-ve	-ve	-ve
<i>Escherichia coli</i> ATCC25992	+ve	+ve	-ve
<i>Klebsiella pneumonia</i> KP72	+ve	+ve	-ve
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA	+ve	+ve	-ve
<i>Streptococcus pneumonia</i> SP42	+ve	+ve	-ve
<i>S. aureus</i> MRSA9	+ve	+ve	-ve

+ve :Résultat positif

-ve : Résultat négatif

L'action des enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine) et non protéolytiques (catalase) ont permis la caractérisation des substances inhibitrice comme étant des bactériocines.

La disparition du halo d'inhibition formé en présence de l'action d'une enzyme protéolytique, explique que l'agent responsable de l'activité antagoniste est de nature protéique (Callewaert et de Vuyst, 2000 ; Aslim *et al.*, 2005 ; Silva *et al.*,2018, Deraz *et*

al., 2005; Todorov et Dicks ; 2005; Parada *et al.*, 2007).

L'activité antagoniste du surnageant de LAB9 et LAB13, est complètement inhibée en présence de l'action de l'enzyme Trypsine, traduite par l'élimination des diamètres des zones d'inhibition formés de *Staphylococcus aureus*.

La disparition de l'activité antagoniste après le traitement des surnageant avec les enzymes protéolytiques a indiqué la sensibilité des composés produits chez les souches isolées, sélectionnées antagonistes à l'action des enzymes protéolytiques.

Les résultats obtenus ont permis de suggérer que l'activité antagoniste des souches isolées, sélectionnées antagonistes est due principalement à la présence d'une substance de nature protéique ou peptidique.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux réalisés par (Manzoor *et al.*,2016 ; Lim *et al.*,2009), qui ont trouvé un large spectre d'activité antimicrobienne contre les pathogènes testés.

En tenant compte des propriétés biochimiques telles que la thermopstabilité, l'hydrophobicité et le pH, la bactériocine produite par *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* semble appartenir aux bactériocines de classe IIa de bactéries lactiques.

L'élucidation de la séquence en acides aminés des bactériocines peut donner un aperçu sur la structure et les relations fonctionnelles et du mode d'action.

7.4. Etude du suivi de la cinétique de croissance des bactéries lactiques et la production des bactériocines.

Les cinétiques de croissance des bactéries bactériocinogènes et de production de la bactériocine chez les souche isolées sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) ont permis l'exploration de l'étape de production des bactériocines.

Des travaux antérieurs réalisés par (De Vuyst et Vandamme, 1992) ont rapporté que les bactériocines des bactéries lactiques sont des métabolites primaires, produites au cours de la phase exponentielle (Kleinkauf *et al.*,1986).

L'étude de l'activité antagoniste des souches lactiques sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) nécessite une bonne connaissance de la physiologie bactérienne, la synthèse protéique et la régulation de ces composés inhibiteurs.

Par ailleurs, l'étude de l'effet de la valeur du pH sur l'activité antagoniste des souches lactiques sélectionnées (LAB9 et LAB13) au cours des différentes phases de la croissance bactérienne est mise en évidence par le suivi de l'évolution du potentiel d'hydrogène (pH).

Les courbe de croissance des souches lactiques antagonistes (LAB9 et LAB13) ont

manifesté un comportement physiologique différent, par le fait que les phases exponentielles de croissance des souches sont atteintes après (5, 2) heures d'incubation respectivement. Cependant, les phases stationnaires des souches (LAB9 et LAB13) sont apparues après (17,6) heures d'incubation respectivement.

La corrélation entre la courbe de la cinétique de croissance et de l'activité antagoniste de LAB9 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (**Figure 44**) a permis de constater que l'activité antagoniste a augmenté progressivement au début de la phase exponentielle et atteint un maximum après 17 heures d'incubation et s'est stabilisé durant la phase stationnaire. La sécrétion des molécules responsables de l'activité antagoniste a augmenté au fur et à mesure de la croissance bactérienne et atteint son maximum de production à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire lors de l'acidification du milieu de culture.

Les relations entre la biomasse bactérienne, l'évolution de la valeur de pH et l'activité bactériocine de LAB9, ensemencée dans un milieu de culture MRS à une température de 37°C pendant 24 heures sont déterminés (**Figure 36**).

Les résultats obtenus de l'activité de bactériocine de LAB9 ont montré que la production de la bactériocine est déclenchée 5 heures après l'inoculation du milieu de culture et augmente considérablement durant la phase stationnaire après 17 heures d'incubation.

L'étude du suivi de l'évolution de la valeur du pH durant les différentes phases de croissance a montré que durant les 30 heures de culture, la valeur de pH a diminué de 6,7 à 5,6.

Par ailleurs, l'étude du suivi de la production de bactériocine chez la souche LAB13 durant les différentes phases de croissance a montré que la production de bactériocine est déclenchée après 2 heures d'incubation et atteint un maximum de production après 6 h d'incubation.

En outre, la valeur du pH du milieu de culture a diminué considérablement de 6,7 à 4,4 durant les 30 heures de culture.

Des travaux antérieurs réalisés par (**Kouakou et Thonart, 2011**) ont rapporté que la production des molécules responsables de l'activité antagoniste a augmenté au fur et à mesure de la croissance bactérienne et atteint son maximum de production à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire (**Kouakou et Thonart, 2011**).

Les résultats de l'étude du suivi de la cinétique de croissance des deux souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) concordent avec les travaux rapportés par (**Bellil et al., 2014 ; Benmechernene et al., 2013**) sur la réduction considérable de la biomasse des souches pathogènes, incubées en présence des souches sélectionnées antagonistes (LAB9

et LAB13).

La production de bactériocine souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) est effectuée durant la phase exponentielle, accompagnée avec une production maximale la phase exponentielle tardive de la croissance.

Une réduction de l'activité inhibitrice au cours de la phase de croissance stationnaire tardive est observée, ceci est expliquée par la dégradation protéolytique, et l'agrégation de bactériocine (Aasen, Møretrø, Axelsson et Storo, 2000; De Vuyst, Callewaert et Crabbe, 1996). Un comportement similaire est observé dans la production de mésentéroïne 52 (Mathieu, Suwandhi, Rekhif, Milliere et Lefebvre, 1993).

Cependant, La leuconocine J et la mésentéroïne 5 sont produites pendant la phase exponentielle tardive de la croissance (Choi *et al.*, 1999; Daba *et al.*, 1991).

Lc. mesenteroides E131 produit la mésentéroïne 5, la mésentéricine ST99 et la leucocine C (Daba *et al.*, 1991 ; Todorov , Dicks, 2004 ; Fimland *et al.*, 2002).

En conclusion, l'activité antagoniste de (LAB9 et LAB13) est observée durant le début de la phase exponentielle de croissance et atteinte son maximum lors de l'acidification du milieu de culture. Le mode d'action des bactéries lactiques dépend de plusieurs facteurs, tels que la dose de bactériocine et le degré de purification, l'état physiologique, le type de souches indicatrices, ainsi que les conditions expérimentales (Cintas *et al.*, 2001).

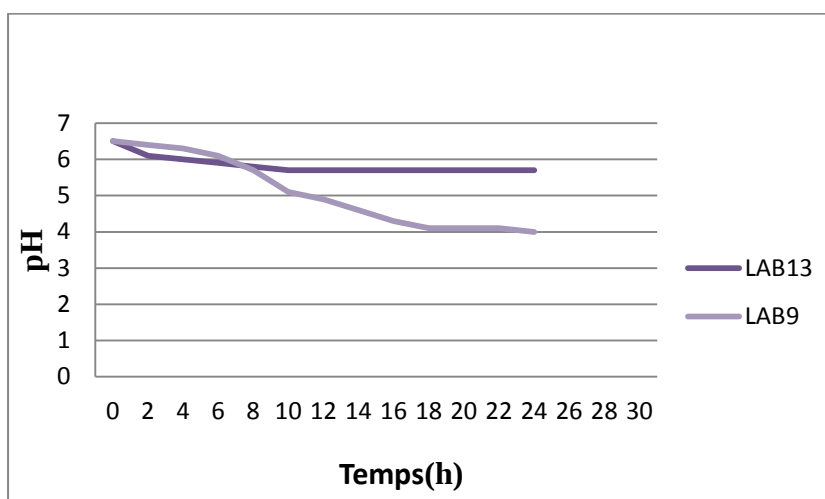


Figure 36 : L'étude du suivi de la cinétique de croissance de LAB9 et l'activité antagoniste (A). Evolution du pH au cours de la croissance en bouillon MRS (B), incubée à une température de 37°C.

8. Purification partielle de la bactériocine

Les méthodes de purification des bactériocines sont nombreuses et variées telles que l'ultrafiltration par des filtres Millipore et précipitation avec le sulfate d'ammonium (Piva et Headon, 1994 ; Gao et al., 2010).

Le sulfate d'ammonium largement utilisé pour la concentration de nombreuses protéines. La précipitation des protéines au sulfate d'ammonium est un procédé de séparation basé essentiellement sur le degré de solubilité de la protéine (Osterlund et Janson, 1997).

La précipitation des protéines au sulfate d'ammonium d'un surnageant de culture bactérienne est récupéré par centrifugations d'une culture, inoculée sur le milieu de culture MRS liquide.

Une saturation de 20% est réalisée et le précipité obtenu est resuspendu dans un volume initial d'une solution du tampon de 0,2M K/Na₂, ajusté à une valeur de pH7.

Ensuite, une concentration adéquate est ajoutée au le surnageant récupéré pour l'obtention d'une saturation de 30%, et d'autres précipitations jusqu'à 60%.

Les résultats obtenus ont montré que la purification des bactériocines par le fractionnement partiel du surnageant avec le sulfate d'ammonium, a induit une augmentation considérable de l'activité antagoniste de (LAB9 et LAB13) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. La fraction (60%) a manifesté une forte activité antagoniste vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (Figure 37).

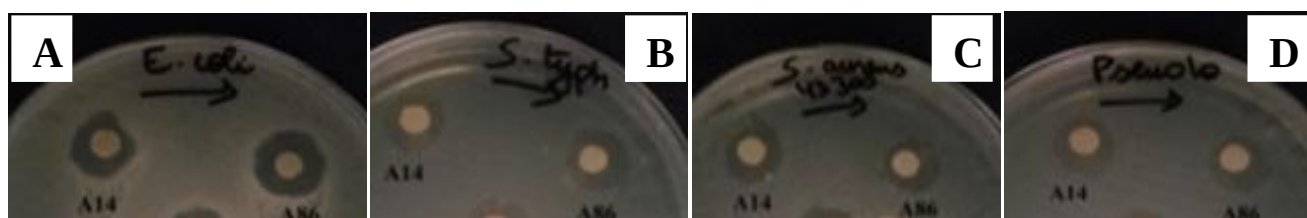


Figure 37: Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées *Lactococcus raffinolactis* (A14), *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* (A86) vis-à-vis de germes pathogènes (a) *E. coli* ATCC25992 ; (b) *S. typhi* ATCC14028; (c) *S. aureus* (MRSA9) ;(d) *Pseudomonas aeruginosa* (PA) par précipitation avec le sulfate ammonium et dialyse du surnageant.

Les résultats de l'activité antagoniste obtenus ont montré que l'utilisation de la bactériocine de (LAB9 et LAB13) partiellement purifiée, a augmenté les diamètres des zones d'inhibitions de (2.5-3.5 mm) et de (3-3,75 mm) respectivement.

Tableau 10 : Précipitation de bactériocine produites chez les bactéries lactiques isolées, sélectionnées, antagonistes (LAB 9 et LAB13). Avec le sulfate d'ammonium et dialyse.

Pourcentage de saturation (sulfate d'ammonium)		Récupération à 1/10 du volume initial
Sur. natif		13
20%	S	14
	P	1
50%	S	1
	P	14
60%	S	0
	P	15
70%	S	0
	P	0
80%	S	0
	P	0

S: surnageant P: précipité Les diamètres sont mentionnés en mm.

Cependant, les faibles valeurs des diamètres des zones d'inhibitions formées avec une saturation de 50% de sulfate d'ammonium explique que les bactériocines des souches isolées sélectionnées antagonistes ne sont pas totalement précipitées à ce degré de saturation.

Cependant, les diamètres des zones d'inhibitions formées avec une saturation de 60% de sulfate d'ammonium sont de l'ordre de 15 mm.

Une saturation de 60% de sulfate d'ammonium est adéquate la récupération des bactéries produites chez les souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB 9 et LAB13).

Des travaux antérieurs réalisés par (Maurya, 2012) ont rapporté une bactériocine produite par *Leuconostoc mesenteroides* CHBY46, isolée à partir de Lait de dromadaire algérien.

Par ailleurs, (Bellil *et al.*, 2017 ; Novotny *et al.*, 1992 ; Ohmomo *et al.*, 2000 ; Deraz *et al.*, 2005 ; Kumari *et al.*, 2011) ont rapporté sur la précipitation des bactériocines avec une saturation de (60-65%) de sulfate d'ammonium, extraite du filtrat de culture de *Bacillus thermoleovorans*, de l'entéroïne ON-157 produite chez *Enterococcus faecium* NIAI 157, l'acidocine D20079 produite chez *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 et produite chez *Lactococcus lactis subsp lactis* LL171 respectivement.

(Faye *et al.*, 2000, Todorov *et al.*, 2007 ; Albano *et al.*, 2007 ; Hata *et al.*, 2010) ont rapporté sur la précipitation des bactériocines à une saturation de 40%, telles que la propionicine T1, la bactériocine AMA-k et la bactériocine HA-6111-2 produites chez *Propionibacterium thoenii* T1, *Lactobacillus plantarum* AMA-K et *Pediococcus acidilactici*.

Cependant, la curvaticine L442 produite chez *Lactobacillus curvatus* L442 et la bactériocine SD1 produite chez *Enterococcus faecium* SD1 sont précipitées à une de 50% de saturation avec le sulfate d'ammonium (Xiraphi *et al.*, 2005 ; Schirru *et al.*, 2012)

(Gong *et al.*, 2010 ; Jiminez Diaz *et al.*, 1995 ; Floriano *et al.*, 1998 ; Jiang *et al.*, 2012) ont rapporté une précipitation de la plantaricine MG à une saturation de 70% de la plantaricine S produite chez *Lactobacillus plantarum* LPCO10, la bactériocine ENTI produite chez *Enterococcus faecium* 6T1a, et la sakacine LSJ618 produite chez *Lactobacillus sakei*.

On peut conclure que les bactériocines sont précipitées avec le sulfate d'ammonium à une saturation bien définie.

9. Détermination de la CMI La concentration minimale inhibitrice

CMI est la la plus faible concentration permettant d'éradication des bactéries nuisibles (effet bactéricide) (Jarlier, 2004). Cependant, La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration induisant l'absence de toute sorte de croissance sur milieu de culture solide, inoculée avec une souche témoin de l'activité inhibitrice *S.aureus* en présence de différentes concentrations de bactériocine des souches isolée, sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) à une température de 37°C pendant 24 heures.

A partir d'un tube, présentant aucune croissance, un volume de 100µl est inoculée dans le milieu de culture MRS solide, pour la détermination de la CMB.

Les résultats obtenus de la CMI, CMB sont illustrés dans les (Tableaux 11, 12).

Tableau 11 : Détermination de la CMI et CMB du surnageant de la souche LAB9.

	MRS	S (AU/ml)								
		32	64	80	96	128	160	192	256	320
CMI	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CMB				+	-					

+ : présence de croissance. S : Surnageant - : absence de croissance

Tableau 12 : Détermination de la CMI et CMB du surnageant de la souche LAB13.

	MRS	S (AU/ml)								
		32	64	80	96	128	160	192	256	320
CMI	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CMB						+	+	-		

+ : présence de croissance. S : Surnageant - : absence de croissance

Les résultats obtenus ont montré que la CMI des bactériocines produites chez les souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB 9, LAB13) est de l'ordre de (80, 128 AU/ml) respectivement. Cependant, la CMB des bactériocines produites chez les souches isolées sélectionnées antagonistes (LAB 9, LAB13) est de l'ordre de (96, 192 AU/ml) respectivement.

Les isolats cliniques multirésistants se manifestent sensibles bactériocines, et présentent des valeurs variables entre les différentes espèces.

Des travaux antérieurs réalisés par (Jasniewski *et al.*, 2008 ; Naghmouchi, 2007) ont rapporté sur les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2, présentant une CMI 04 mg.l⁻¹ vis-à-vis de *L. ivanovii* et *L. innocua*; et la pediocine PA-1 (CMI 6.25-12.5 µg.l⁻¹) vis-à-vis de *L. monocytogenes* LSD530 et *L. monocytogenes* LSD538.

Par ailleurs, La leucocine KM432Bz se manifeste particulièrement efficace contre les bactéries à Gram positif phylogénétiquement étroites, avec des CMI comprises entre 0.08-10 µM.

En outre, la leucocine KM432Bz se manifeste également active contre les bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes*, avec une CMI de 156 nM et présente un effet bactéricide sur la croissance de *Lb. sakei subsp. sakei* et un effet bactériostatique sur *L. monocytogenes* (Makhloufi, 2011).

10. Mode d'action des bactériocines

L'effet de la bactériocine des bactéries lactiques isolées, sélectionnées (LAB9 et LAB13) vis-à-vis d'*E. coli* ATCC25992, *S. typhi* ATCC14028, *S. aureus* (MRSA9), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est évalué par la production de la biomasse bactérienne. A cet effet, la bactérie pathogène *P. aeruginosa* (PA) est inoculée dans le milieu de culture liquide MRS, avec une densité optique initiale de 0,5 mesurée à une longueur d'onde de 625 nm, incubée à une température de 30 ° C pendant 24 heures, un volume de 1 ml des surnageants des bactéries lactiques isolées, sélectionnées (LAB9 et LAB13) est ajouté 5 heures après le début de la croissance bactérienne.

Les résultats obtenus (Figure 38,39) ont montré une inhibition considérable de la croissance *P. aeruginosa* (PA), après l'ajout d'un volume de 1 ml des surnageants des bactéries lactiques isolées, sélectionnées (LAB9 et LAB13). Cette inhibition est expliquée par l'arrêt du cycle cellulaire de *P. aeruginosa* PA (une croissance déséquilibrée), en comparaison avec la biomasse non traitée (croissance équilibrée).

,

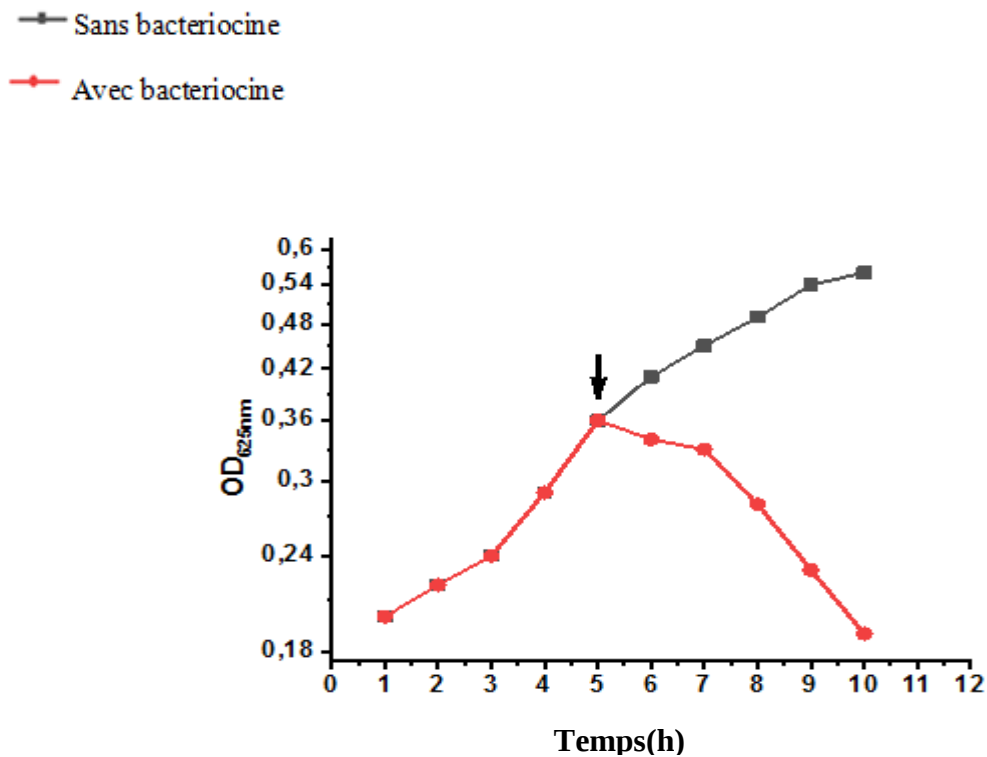


Figure 38: L'étude du suivi de la cinétique de croissance de *P. aeruginosa* (PA) en présence et en l'absence de surnageant de LAB 9, inoculée dans le milieu de culture liquide MRS, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

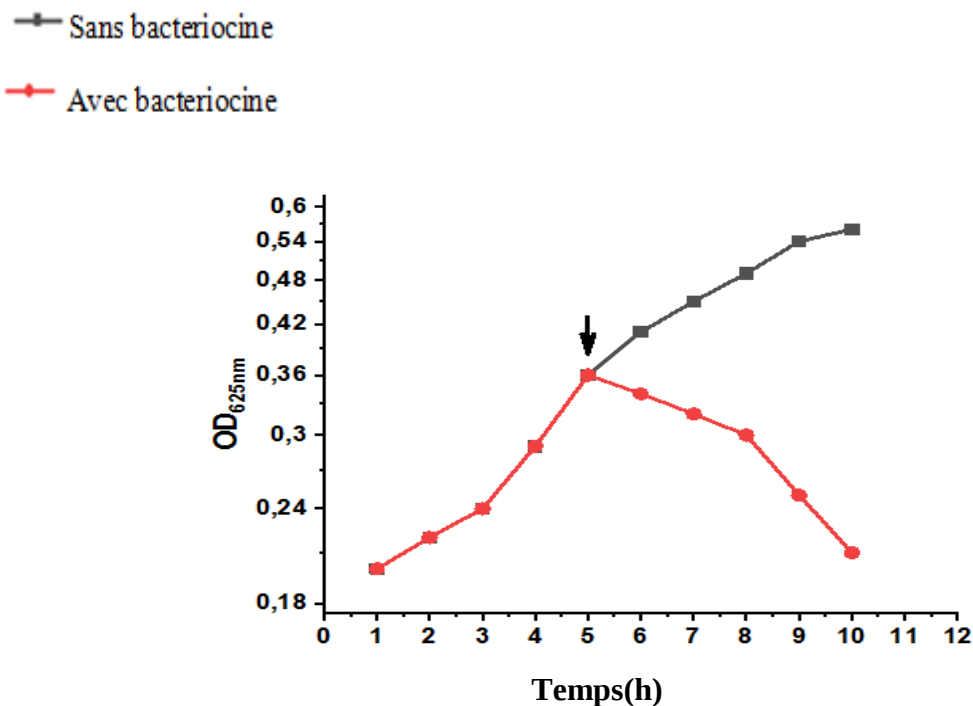


Figure 39: L'étude du suivi de la cinétique de croissance de *P. aeruginosa* (PA) en présence et en l'absence de surnageant de LAB 13, inoculée dans le milieu de culture liquide MRS, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures. Pendant les premières 7 heures, la croissance de *Staphylocoque* est stable (DO

<0,2) dans le milieu de culture utilisé, et une augmentation considérable de la biomasse (DO > 1,6) la culture non traitée (contrôle). Ensuite, la biomasse de *Staphylocoque* a diminué dans la culture traitée avec le surnageant de *Leuconostoc*.

Piard et Desmazeaud (1992) et Casla et al. (1996), ont rapporté que les bactéries ayant des pouvoirs antibactériens peuvent avoir trois types d'effets : un effet bactériostatique qui se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance, effet bactéricide qui se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire, ou alors un effet bactéricide sans lyse cellulaire.

Les résultats obtenus ont montré une importante activité bactéricide des molécules antibactériennes produites chez les souches isolées (LAB9 et LAB13) vis-à-vis de *Pseudomonas* et activité bactériostatique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Des résultats similaires sont observés chez l'entéroïne MR99, qui exerce un effet bactéricide contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* et contre des agents de la mammites bovine, et présente une activité bactériostatique contre la bactérie *E.coli* (**Sparo et al., 2006**).

Le mode d'action des bactériocines dépend des bactéries cibles utilisées et leur concentration.

Zamfir et al., (1999) ont montré que l'acidophiline 801 a manifesté des effets bactériostatiques lorsque sa concentration est inférieure à 250 AU/ml. Cependant, lorsque la concentration dépasse les 250 AU/ml, l'acidophiline 801 a présenté un mode d'action bactéricide.

Van Belkum et al., (1992), ont rapporté que la lacticine produite chez *Lc. lactis* est active contre *Escherichia* et *Salmonella*.

Par ailleurs, les travaux réalisés par **Ryan et al. (1996) et Dougherty et al. (1998)** ont montré que la lacticine 3147, bactériocine produite chez *Lc. lactis* DPC 3147, possède un large spectre d'inhibition contre *Escherichia*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Listeria*.

11. Activité antibiofilm de la bactériocine

La capacité des bactéries à des biofilms a attiré considérablement l'intérêt des scientifiques. Les biofilms sont une communauté multi-microbienne intégrés dans une matrice polymérique, attachés sur une surface biotique ou abiotique (**Miquel et al., 2016**).

En outre, la formation des biofilms et l'expression des facteurs de pathogénicité sont étroitement associés dans le système régulateur des cellules procaryotes (**Rybalchenko et al., 2015**). De ce fait, l'étude des interactions entre les bactéries et les

surfaces dans des environnements spécifiques (médicales ou agroalimentaires) afin de fournir des mesures plus efficaces pour lutter contre la formation des biofilms (**Ait Ouali et al.,2014**).

Les bactéries lactiques peuvent être utilisées pour la colonisation des surfaces en contact avec les aliments et empêcher la fixation des germes pathogènes.

L'étude de l'activité antibiofilm de deux bactéries lactiques, isolées sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) est mise en évidence pour la réduction de la formation de biofilm et la fixation de bactéries pathogènes

L'utilisation de la méthode de dosage rapide en microplaque de 96 puits a permis la détermination de spectres d'actions des molécules antibiofilm produites chez isolées sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13)

Les bactéries adhérentes à la surface des puits sont révélées par une coloration au cristal violet, quantifiées par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 630 nm à l'aide d'un spectrophomètre après leur solubilisation dans l'éthanol.

Notamment, le genre *Leuconostoc* a fait l'objet d'une investigation sur le potentiel antibiofilm, et a manifesté une inhibition considérable (92 et 87.79%) contre la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* respectivement (**Salman et al., 2015**).

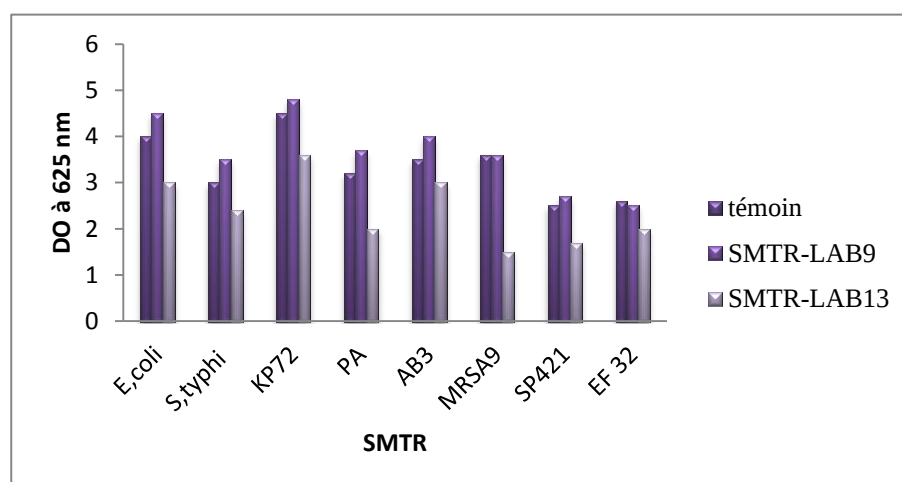


Figure 40: Activité inhibitrice du surnageant LAB9 et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilm auprès des bactéries pathogènes.

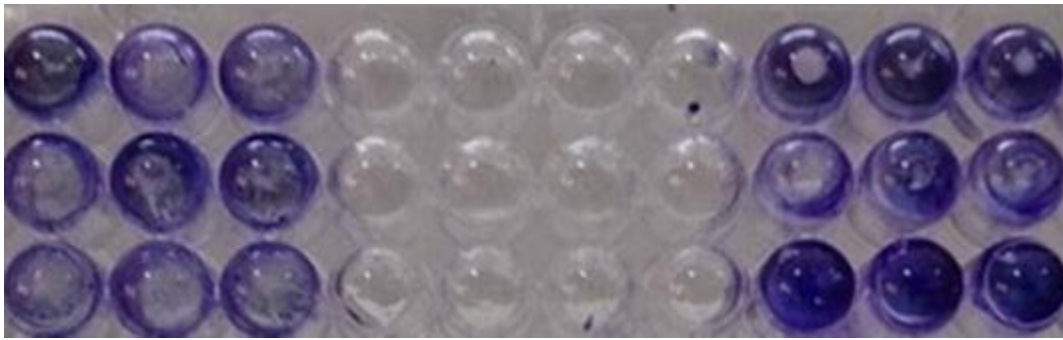


Figure 41 : Activité inhibitrice du surnageant LAB9 et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilm auprès *S.aureus* par la méthode TCP.



Figure 42 : Activité inhibitrice du surnageant LAB9 et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilm auprès *S.aureus* par la méthode TM.

Les résultats obtenus ont montré que les bactéries pathogènes testées sont fortement adhérentes. La présence du surnageant de culture des souches LAB13 a réduit l'adhérence des bactéries *S. aureus* et *P.aeruginosa*. Cependant, le surnageant de LAB9 a manifesté aucune influence sur l'adhérence des bactéries pathogènes.

Des travaux antérieurs réalisés par **Ait Ouali et al. (2014)** ont montré que les surnageants de culture des bactéries lactiques, sont capables d'empêcher l'adhérence de la souche *S. aureus* SA3, et la formation de biofilm.

Pimentel-Filho et al. (2014) ont montré que la biovicine HC5 et la nisine ont inhibé l'adhérence de la bactérie *S. aureus* et la formation de biofilm. **(Todoriki et al. 2001)** ont montré que les substances antimicrobiennes contenues dans le surnageant de culture des bactéries lactiques sont responsables de l'activité anti-adhésion.

Tran et al. (2014) ont rapporté sur le revêtement des instruments médicaux par des substances antimicrobiennes pour empêcher la formation des biofilms.

Par ailleurs, **Robert et al. (2012)** ont rapporté sur la capacité de certaines bactéries à former des biofilms de bactéries néfastes **(Høiby et al., 2013)**.

Conclusion générale et Perspectives

CONCLUSION

Le lait cru de **chameau** et de chèvre algérien est largement consommé dans les régions arides et semi-arides en raison de leur haute valeur nutritionnelle et médicinale et de leurs activités protectrices.

Dans ce présent travail, une large gamme de bactéries lactiques, sont isolées à partir du lait de chamelle et chèvre de la région de Ouargla et de fromage artisanal Jben et Kamaria.

Dans un premier temps, les bactéries lactiques isolées sont caractérisées par l'étude de l'activité antagonistes vis-à-vis de germes pathogènes isolées à partir de milieu hospitaliers sont identifiées phénotypiquement et biochimiquement. En outre, l'isolement de bactéries à partir du milieu hospitalier, a révélé la présence de germe avec une forte résistance aux antibiotiques, ce qui rend le traitement difficile et l'émergence de pathologies.

Dans un deuxième temps, l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolée (200 isolats) est mise en évidence vis-à-vis des bactéries pathogènes multirésistantes isolées du milieu hospitalier.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéroicide (CMB) des bactériocines des bactéries lactiques isolées, sélectionnées antagonistes (LAB9, LAB13), extraites par précipitation au sulfate d'ammonium, sont déterminées 80, 128 AU/ml et 96, 192 AU/ml.

L'évaluation de l'activité anti-biofilm du surnageant neutralisé de LAB13 a montré une importante inhibition de la formation de biofilm vis-à-vis de nombreuses bactéries à Gram-positif et négatif, ce qui explique la formation de biofilm de pathogènes est fortement liée à la souche probiotique et pathogène.

Par ailleurs, les bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées à partir de lait (**chameau** et chèvre) et de produits laitiers fermentés traditionnels (Jben, kamaria) de la région sud de l'Algérie ont manifesté une importante activité antagoniste vis-à-vis d'un large spectre de BMR, ce qui a expliqué l'importance de ce groupe bactérien pour la santé humaine.

En effet, les bactéries isolées *L. raffinolactis* LAB9 et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 a indiqué une excellente activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes cliniques et l'exploration des bactériocines purifiées produites comme molécule puissante dans la lutte contre les infections nosocomiales en milieu hospitalier, la dissémination de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, semblent poser un grave problème de santé publique.

En outre, la compréhension des mécanismes de la résistance aux antibiotiques sera requise de toute urgence pour atténuer les préoccupations en matière de santé. L'application

thérapeutique alternative de la bactériocine est devenue un outil utile en raison de ses propriétés multifonctionnelles. En outre, il serait intéressant de savoir quelle classe fonctionnelle est responsable de l'activité antagoniste de la bactériocine produite par *L. raffinolactis* LAB9 et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 .

En perspectives, ce travail peut être accompli par :

- ✓ Des études approfondies sur l'ingénierie des protéines seront intéressantes pour générer des bactériocines avec des fonctions entièrement nouvelles.
- ✓ Le séquençage des régions d'ADN qui code la production de bactériocines pour une éventuelle caractérisation afin de mieux connaître leurs propriétés physicochimiques.
- ✓ L'amélioration de la production par des méthodes génétiques.
- ✓ La caractérisation des sites de fixation du substrat et le site de la spécificité par des mutations dirigées.
- ✓ La purification des protéases surexprimées par les différentes méthodes de chromatographie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Ababsa, A. (2012). Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de Magister en Génie microbiologique, Université Ferhat Abbas , Setif.

Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Mirhadi Zadi ,T., Kuliyeu, A., Franco, B.D.G.,Chobert, J-M., Haertlé ,T.(2013).Evalua-tion of antibacterial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* .30(2): 631-641.

Ait ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., Chihib, N.E., Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 191: 116-124.

Albano, H., Todorov, S.D.,van Reenen, C.A., Hogg, T., Dicks, L.M.T., Teixeira, P.(2007). Characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 239-247.

Allgaier, H., Jung, G., Werner, R.G., Schneider,U.et Zahner, H. (1986). Epidermin Squencing of a heterodet tetracyclic 21- peptide amide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* 160: 9-22.

Ammor,S.,Tauveron,G., Dufour,E. et Chevallier,I. (2006)."Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility." *Food Control* .17: 454-468.

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., Koidis, P. (2008). Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. *Bioresour. Technol.* 99: 5384-5390.

Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N., & Gunasekaran, P. (2009). Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin (s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource technology*.100(2): 872-877.

Arakawa, K., Yoshida, S., Aikawa, H., Hano, C., Bolormaa, T.,Burenjargal, S., Miyamoto, T. (2016). Production of a bacteriocin-like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 isolated from Mongolian fermented mare milk, airag. *Animal Science Journal*. 87(3): 449-456.

Asahina, T., Hara, K., Arakawa, K., Nakano, H.et Miyamoto, T. (2012). Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag. *Animal Science Journal*.83(10) :704-711.

Aslim, P.,Yuksekdag,Z.N.,Sarikaya ,E.et Beyatli,Y. (2005). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT – Food Sci. Technol.* 38:691-694.

Auger, M.(2012). Formation de biofilms in vitro par des souches clinique de E .COLI : Impact de la modification de la condition expérimentale. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Nances, N063.

Axelsson,L.(2004). Classification and physiology. In: Salsinen,S.,Wright,A.V., Ouwehand,A.(Eds). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (3ed edition).Marcel Dekker, Inc. New York, USA. vol. 633: 1- 66.

Badis, A., Laouabdia, S.N., Kihal ,M. et Ouzrout ,R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chevre de deux populations caprines locales « arabia et Kabyle ». *sci et Tech.* 23 :30-37.

Barefoot, S. F.et Klaenhammer,T.R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental microbiology.* 45(6): 1808-1815.

Bellil, Y. (2020). Caractérisation et évaluation des aptitudes technologiques des leuconostocs isolés du lait de chamelle Algérien et leurs applications. Thèse de doctorat, Université Oran1.

Bellil,Y., Benmechernene, Z., Bellil, W. C.et Kihal, M. (2018). Antibacterial and antibiofilm activity of the bacteriocin-producing strain *Leuconostoc mesenteroides* CHBY46 isolated from Algerian dromedary milk against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *South Asian Journal of Experimental Biology.* 8(4): 120-131.

Bellil,Y., Benmechernene, Z.,Chahrour,W., Naoui,N., Kihal,M. (2014).Selection and evaluation of anti-listerial activity of *Leuconostoc mesenteroides* wild strains isolated from Algerian raw dromedary milk. *Journal of Food Processing & Technology.* 5: 398.

Benmechernene, Z., Chentouf, H.F., Yahia, B.,Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calomata, P., Barros-Velázquez, J. (2013). Technological Aptitude and Applications of *Leuconostoc mesenteroides* Bioactive Strains Isolated from Algerian Raw Camel Milk . *BioMed Research International* 2013.1-14.

Benmouna, Z. (2019). Etude de bactériocines de bactéries lactiques et leurs effets sur les bactéries pathogènes et/ou d'altération. Thèse de doctorat, Université Oran1.

Biswas, K., Upadhayay, S., Rapsang, G.F., Joshi, S.R. (2017). Antibacterial and Synergistic Activity Against β -Lactamase-Producing Nosocomial Bacteria by Bacteriocin of LAB Isolated From Lesser Known Traditionally Fermented Products of India. *HAYATI Journal of Biosciences* .24(2): 87-95.

- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B. (1991).** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1265-1267.
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R. et Haesebrouck, F. (2009).** Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary microbiology.*135:187–195.
- Buchman,G., Banerjee, S. et Hansen, J. (1998).** Structure, expression and evolution of gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem.* 263:16260-16266.
- Burianek, L. L.et Yousef, A. E. (2000).** Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Letters in Applied Microbiology.* 31(3) :193-197.
- Carattoli, A. (2009).** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 53(6):2227-2238.
- Carine,D.,Tonart,P.(2009).**Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE. VOLUME 13.
- Carle, S. (2009).** La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important!. *Pharmactuel.* 42.
- Carr, F.J., Hill, D., Maid, N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281-370.
- CA-SFM.(2018).**Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.Communiqué 2018. Société Française de Microbiologie, Paris,France: <http://www.sfm.asso.fr>
- Casla ,D., Requena, T., Gomez, R. (1996).** Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus carvatus* IFPL 105. *J. Appl. Bacteriol.*81: 1, 35 – 41.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. et Vignolo,G. (2008).** A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science.* 79:483–499.
- Chevrolet, J.C. et al. (1997).** Prévention des infections à bactéries multi résistante en réanimation : en dehors des modalités d'optimisation de l'antibiotique. *Réanimation urgence.* 167-173.
- Choi, H.J., Lee, H.S., Oh, S. et Yoon, S.S. (1997).** Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc sp.*J2 isolated from the Korean fermented vegetable kimchi. *Journal of Applied Microbiology.* 86 :175-181.

Chopra, I., O'Neill, A., and Miller, K. (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updates*. 6: 137-145.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., et al. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 22: 996–1006.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. et Hernandez, P.E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Technol Int*. 7:281-305.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. et Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*. 71(1):1-20.

Cutler, P.(2004). Methods in molecular biology: protein purification protocols. Humana Press Inc., Totawa, NJ. 239-252.

Daba,H.,Pandian ,S.,Gosselin,J.F., Simard,R.E., Huang,J. et Lacroix,C. (1991). «Detection and Activity of a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides*.» *Appl Environ Microbiol*. 57: 3450-3455.

De Ambrosini,V.M., Gonzalez, S., Perdigon, G., de Ruiz Holgado,A.P., Oliver,G.(1996).«Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species.» *.Chem Pharm Bull*. 44: 2263-2267.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. et Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf life extension. *Int Dairy J*. 16:1058-1071

Delves-Broughton, I. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol*. 44: 100.

Deraz, S.F., Karlsson, E. N., Hedström, M., Andersson, M.M et Mattiasson, B. (2005). Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. Elsevier. *Journal of Biotechnology*. 117 : 343-354.

De Vuyst,L. et Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 13(4) : 194-199.

De Vuyst, L., Callewaert, R. et Crabbé, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* .142:817-827.

De Vuyst, L., Vandamme, E.(1994). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Blackie, London, United Kingdom, 539

- Drenkard, E. (2003).** Antimicrobial resistance of *Pseudomans aeruginosa* bioflms. *Microbs and infection*.5:1213-1219.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M. et Prévost, H. (2006).** The continuing story of class Ha bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564-582
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W. et Jarlier, V. (2008).** Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and benchguide. *Clin Microbiol Infect.* 14: 90-103.
- Dodd, I.A. et Egan, J.B. (1990).** Improved detection of helix-turn-helix DNA binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 18:5019-5026.
- Dougherty, B.A., Hill, C., Weidman, J.F., Richardson, D.R., Ross, R.P. (1998).** Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Molecular Microbiology*.29: 1029 -1038.
- Dublet, B., Bousquet-melou, A. et Madec, J.Y. (2012).**Le concept « one health » en antibiorésistance et les flux de gènes. *Innovations agronomiques.* 24: 79-90.
- Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M. É., Tristan, A. et Vandenesch, F. (2010).** Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*-Les points-clés en 2010. *médecine/sciences.* 26(11) : 943-949.
- Dundar, H., Salih, B. et Bozoglu, F. (2015).** Purification and characterization of a bacteriocin from an oenological strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* .46 :354–359.
- Dündar, H. (2006).** Chracterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Ph.D. thesis, Department of Biotechnology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Turkey.
- Eckner, K. F. (1992).** Bacteriocins and food applications. *Dairy Food Environ Sanit.*12:204-209.
- El Abdani, S. (2016).** Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques et conseils en antibiothérapie. Université Mohammed V-Rabat, faculté de médecine et pharmacie –RABAT. 34.
- Faye, T., Langsrud, T., Nes, I.F et Holo, H. (2000).** Biochemical and genetic characterization of propionicin T1, a bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *American Society for Microbiology. Applied and Environmental Microbiology.* 66 :4230-4236.
- Fihman, V., Le Monnier, A., Corvec, S., Jaureguy, F., Tankovic, J., Jacquier, H., ... et Zahar, J. R. (2012).** *Stenotrophomonas maltophilia*–the most worrisome threat among

unusual non-fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: a prospective multicenter study. *Journal of Infection*.64(4) :391-398.

Finland, G., Sletten,k.et Nissen-Meyer,J. (2002).«The complete amino acid sequence of the pediocin-like antimicrobial peptide leucocin C». *Biochem Biophys Res Commun*.295: 826-827.

Fleming, H.R., Etchell, G.L., Costilow,R.N.(1985).Microbial inhibition by isolate of *pediococcus* from cucumber brine. *Appl and Microbiology*.30:104-1042.

Floret,N.,Bertrand, X.,Thouverez, M., Talon, D.(2009). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie*. 9-11.

Flórez, A. B., Egervärn, M., Danielsen, M., Tosi, L., Morelli, L., Lindgren, S., & Mayo, B. (2006). Susceptibility of *Lactobacillus plantarum* strains to six antibiotics and definition of new susceptibility–resistance cutoff values. *Microbial Drug Resistance*. 12(4):252-256.

Floriano,B.,Ruiz-Barba,J.L.etJimenez-Diaz,R.(1998).«Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocinfamily of bacteriocins». *Appl. Environ.Microb.* 64 : 4883-4890.

Galverz, A., Abriouel, H., Lopez, R. L. et Omar, N.B. (2007). Bacteriocin- based strategies for food bioservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120 (1-2):51-70.

Gao, Y., Jia, S., Gao, Q et Tan, Z. (2010). A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional chinese fermented cabbage. Elsevier. *Food Control*. 21 :76-81.

Garnier, F., Denis, F. (2007). Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre 29 .251, 254.

Garrouste-Orgeas, M., Philippart, F., Timsit, J.F. et al.(2008). Perceptions of a 24-hour visiting policy in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 36(1):30-5.

Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollan, G. et Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Contr.* 20:144-148.

Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. et Manai, M. (2008). Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Contr.* 19:162-169.

Ghazi, F., Benmechernene, Z., Aggad, H., Guessas, B., Moussa-Boudjamaa, B., Henni, D.E et Mebrouk, K.(2006).Phenotypic identification and whole cell protein analysis by SDS-

PAGE of dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *J. Alg des Région Arides*.05: 11- 22.

Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 591-606.

Gong, H.S., Meng, X.C. et Wang, H. (2010). Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella typhimurium*. *J Basic Microbiol.* 50:37-45.

Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W. et Carmeli, Y. (2003). Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*.36(1): 53-59.

Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H. et Nychas, G.J.E. (2008). Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiol.* 25:313-323.

Grande, M. J., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martinez- Canamero, M. et Galvez , A.(2007).Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone oa a combinaison with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* 70: 405-11.

Guessas, B., Fatma, A., Miloud, H.et Mebrouk, K. (2012).Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences Journal*.17 (4): 480-488.

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

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

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire, DUNOD, Paris. P: 80, 84, 116, 282, 283, 291.

Hammami,R.,Fernandez,B.,Lacroix,C.,Fliss,I.(2013).Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell Mol Life Sci.* 70(16):2947-67. doi: 10.1007/s00018-012-1202-3. Epub 2012 Oct 30. PMID: 23109101.

Hammes, W. P.et Hertel, C. H. R. I. S. T. I. A. N. (2006). The genera *lactobacillus* and *carnobacterium*. *Prokaryotes*. 4:320-403.

Hariri, A., Ouis N., Sahnouni, F., Bouhadi, D. (2009). Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 37-55.

- Harlander, S.K. (1993).** Regulatory aspects of bacteriocin use. In: Hoover, D. G. and Steenson, L. R., Editors, 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Academic Press, New York. 233-236.
- Hartmann, H. A., Wilke, T., Erdmann, R. (2011).** Efficacy of bacteriocin-containing cell-free supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 146: 192-199.
- Hassan, Y.I. et Bullerman, L. (2008).** Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *Int J Food Microbiol.* 121:112-115.
- Hata A., Moller H.S., Stensballe A., Lindmark-Mansson H. et Karlsson A.H. 2010.** Effect of minor milk proteins in chymosin separated whey and casein fractions on cheese yield as determined by proteomics and multivariate data analysis. *J. Dairy Sci.* 91: 3787-3797.
- Helander, I.M. et Mattila-Sandholm T. (2000).** Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *Int J Food Microbiol.* 60:153-161.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G.L., Coenye, T., Donelli, G. et al. (2015).** ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect.* 21:1-25.
- Horvath, P., Coûté-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C. et Barrangou, R. (2009).** Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol.* 131:62-70.
- Hummel, A.S., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. (2007).** Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst Appl Microbiol.* 30:1–7.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. et Maneerat, S. (2011).** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.* 22(3–4): 401–407.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. et Ray, B. (1995).** Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol Rev.* 59:171-200.
- Jarlier, V. (2004).** Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français. *Bull Epidemiol Hebdo.* 32-33: 148-51.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G. et Philippon, A. (1988).** Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 10: 867–878.

Jasniewski, J. (2008). Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe Iia. Thèse de doctorat. Laboratoire de Science et Génie Alimentaires, Nancy. 9-55.

Jiang, J., Shi, B., Zhu, D., Cai, Q., Chen, Y., Li, J., Qi, K. et Zhang, M. (2012). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. Elsevier. *Food Control*. 23: 338-344.

Jiminez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H. et Warner, P. J. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied And Environmental Microbiology*. 61: 4459-4463.

Joffin, J.N. et Leyral, G. (1996). Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France. 219-223.

Jones, R. N. (2001). Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest*. 119(2): 397S-404S.

Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31:224-245.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49 :209-224

Khedid, K., Faïd, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A. et Zinedine, A. (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* 10:10-16.

Khiev, B. et Veber, B. (2010). Patient BMR + : risques de contamination et prévention en pré hospitalier et aux urgences. 52e congrès national d'anesthésie et de réanimation. Infirmiers. Infirmier(e)s d'urgence. Sfar.

Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Logan, B., Buck, B. et Azcarate-Peril, M.A. (2005). "Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health." *FEMS Microbiol.* 29: 393-409.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 12(1-3) : 39-85.

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

Klein, A. (2014). Jean-Paul Vuillemin (1861-1932): l'inventeur nancéien du concept d'antibiotique. Hal. Archives-ouvertes. *Revue médicale de l'Est*. 08 (1): 01-07. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00984423>



- Kleinkauf, H., von Döhren, H., Dornauer, H. et Neemann, G. (1986).** Regulation of Secondary Metabolite Formation. Weinheim : VCH. In Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. De Vuyst, L et Vandamme, E. J. (1992). *J Gen Microbiol.* 138 : 571-578.
- Kouakou, P. et Thonart, Ph. (2011).** Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire Indésirable. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2): 339-348
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerebezem, M. et de Vos, W. M. (1998).** Quorum sensing- controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology.* 64: 15–21.
- Kumar, M.A., Murugalatha, N. (2012).** Isolation of *Lactobacillus plantarum* from cow milk and screening for the presence of sugar alcohol producing gene. *J Microbiol Antimicrob.* 4:16–22.
- Kumar, M., Tiwari, S.K., Srivastava, S. (2010).** Purification and characterization of enterocin LR/6, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* LR/6. *Appl Biochem Biotechnol.* 160:40–49.
- Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachoui, M. et Ouhssine, M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin-société de pharmacie de bordeaux. 144, 237.
- Lagha, N. (2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat . Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd ,Tlemcen.
- Larpen, S.P. (1997).** Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Ed. Tech et Doc, Lavoisier, Paris.
- Lim, I.S., Lee, H.S., Kim, W.Y. (2009).** The effect of lactic acid bacteria isolates on the urinary tract pathogens to infants In vitro. *J. Korean Med. Sci.* 24: S57–S62.
- Leveau, J.Y. et Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, edited by Tec & Doc (Lavoisier. Paris). 85-87.
- Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K., et Shioya, S. (2001).** Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 91(4): 390-395.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry.* 193: 265-275.
- Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B. et Riley, M. A. (2011).** Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *The ISME journal.* 5(1): 71-81.

- Mäkelä, P., Schillinger, U., Korkeala, H. et Holzapfel, W. H. (1992).** Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*.16:167-172.
- Makhloufi, K.M. (2011).**Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.
- Makras,E. et De Vuyst,L (2006).** The in vitro inhibition of Gram-negative Pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal* .16: 1049-1057.
- Mami, A., Ahmed, K., et Mebrouk, K. (2014).** Study of the antimicrobial and probiotic effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from raw goat's milk from the region of Western Algeria. *World Applied Sciences Journal*. 32(7): 1304-1310.
- Manzoor, A., Ul-Haq, I., Baig, S., Qazi, J. I., & Seratlic, S. (2016).** Efficacy of locally isolated lactic acid bacteria against antibiotic-resistant uropathogens. *Jundishapur journal of microbiology*. 9(1).
- Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C.L. (1991).** « Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries » .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- Marugg, J.D., Gonzalez, C.F., Kunka, B.S., Ledeboer, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y. et al. (1992).** Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidi lactici* PAC1.0. *Appl Environ Microbiol*. 58:2360-2367.
- Mathieu, F., Sudirman Suwandhi, I., Rekhif ,N., Millière, J.B., Lefebvre, G. (1993).** Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* FR52. *J Appl Bacteriol* .74: 372-379
- Mathot, A. G., Kihal, M., Prevost, H.et Divies, C. (1994).** Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *International Dairy Journal*. 4(5):459-469.
- Maurya, A.P., Thakur, R.L. (2012).** Inhibition spectrum, purification and characterization of bacteriocin from *Leuconostoc* NT-1. *Current Science* .103(12): 1405-1407.
- McLeod ,A., Nyquist,O.L. , Snipen, L., Naterstad, K. et Axelsson, L. (2008).**"Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods." *Syst Appl Microbiol* .31 :393-403.
- Merino, L.A., Hrenuk, G.E., Alonso, J.M., Ronconi, M.C. (2000).** Interêt de l'antibiotypie et la bactériocinotypie pour différencier les souches de *Shigella* isolées en Argentine. *Bull Soc*

Pathol Exot .93(5):307–310.

Mezaini, A., Chihib, N.E., Boura, A.D., Nedjar-Arroume, N. et Hornez, J.P.(2009). Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product. *J. Environ. Publ. Health*.

Meziani, M. (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et Pseudomonas. Thèse de magister Spécialité : BIOCHIMIE. Université Mentouri Constantine.

Minchella, A., Molinari, L., Alonso, S., Bouziges, N., Sotto, A., & Lavigne, J. P. (2010). Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. *Pathologie biologie*.58(1):1-6.

Miquel, S., Lagrafeuille, R., Souweine, B. et Forestier, C. (2016). Antibiofilm Activity as a Health Issue. *Frontiers Microbiology*. 7: 592.

Moëller, V. (1955). Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand*. 36: 158-172.

Mohankumar, A. (2011). Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. *Int J Biol*. 3:3.

Mokdad, F.H., Benmechernene, Z., Benyoucef ,A., Russo, N., Randazzo, C.L., Caggia, C., Kihal,M. (2020). Characterization of bioactive *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin strains isolated from camel's and goat's Algerian raw milks. *Ponte*. 76(3) :32-61.

Mota-Meira, M., Lapointe, G., Lacroix, C., & Lavoie, M. C. (2000). MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.44(1):24-29.

Moretro ,T., Aasen, I.M., Storro I. et Axelsson, L.(2000). Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol*. 88(3):536-545.

Naghmouchi, K., Kheadr, E., Lacroix ,C. et Fliss I., (2007). Class I/Class IIa bacteriocin crossresistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*. 24 (7-8): 718-27.

Ndeli, L.(2009). Etude des prescriptions d'antibiotiques gérées en milieu officinal. Thèse de Doctorat en médecine. Faculté de Médecine de Pharmacie Et d'Odontostomatologie. Université de Bamako. 04p

Nigatu, J. M., Tuji, F. A. et Tefera, A. T. (2015). Evaluation of the antagonistic effect of six mixed cultures of lactic acid bacteria, isolated from the Ethiopian fermented milk ergo, against some foodborne pathogens inoculated into the Ethiopian cottage cheese ayib. *African Journal of Microbiology Research*. 9(29):1789-1797.

- Nigutova, K., Morovsky, M., Pristas, P., Teather, R.M., Holo, H., Javorsky, P., (2007).** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 102(2): 563-569.
- Novotny, J. F. et Perry, J. J. (1992).** Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. *Applied and environmental microbiology*. 58(8): 2393-2396.
- Nukaga, M., Mayama, K., Hujer, A. M., Bonomo, R. A. et Knox, J. R. (2003).** Ultrahigh resolution structure of a class A β -lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *Journal of molecular biology*. 328(1): 289-301.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M et Nakanishi, K. (2000).** Purification and some characterization of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 81-89.
- Osterlund, B. et Janson, J. C. (1997).** A strategic Approach to protein purification. *Pharmacia. Biotechnol.* 2 (3): 8-10.
- Paik, H. D., Bae, S. S., Park, S. H., & Pan, J. G. (1997).** Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19(4): 294-298.
- Papagiannin, M. (2003).** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.* 21(6): 465-499.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P. et Soccol, C.R. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz Arch Biol Technol.* 50:521-542.
- Patwardhan, R.B., Dhakephalkar, P.K., Niphadkar, K.B. et al. (2008).** A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multirésistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *Indian Journal of Medical Research*. 128(2):178.
- Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014).** Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial cell factories* .13(S1):1-13.
- Pfeiler, E.A. et Klaenhammer, T.R. (2007).** "The genomics of lactic acid bacteria." *TRENDS MICROBIOL* .15: 546–553.
- Philippon, A. et Arlet, G. (2006).** β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin*. 64(1): 37-51.

Piard, J.C. et Desmazeaud, M.J. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*. 72: 113-142.

Piper, C., Hill, C., Cotter, P.D. et Ross, R.P. (2011). "Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z." *Microb Biotechnol* .4: 375–382.

Piper, C., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2009). Discovery of medically significant lantibiotics. *Curr Drug Discov Technol*. 6:1-18.

Pimentel-Filho, N.J., Martins, M.C., Nogueira, G.B., Mantovani, H.C. et Vanetti, M.C. (2014). Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *Int J Food Microbiol*. 190:1-8.

Pitt, T. L. et Gaston, M. A. (1995). Bacteriocin typing. In *Diagnostic Bacteriology Protocols* . Humana Press. 5-14

Piva, A. et Headon, D.R., (1994). Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbial*. 140: 697-702. In Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers, Verna Carolissen-Mackay, Gottlieb Arendse, John W. Hastingsb, (1996).

Poirel, L. et Nordmann, P. (2006). Résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii*: évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques*. 8(2): 100-107.

Quadri, L., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., Roy, K.L., Vederas, J.C. et al. (1997). Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J Bacteriol*. 179:6163-6167.

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

Rahal, K., Belouni, R. et Benslimani, A. (2005). Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. Rec de L'OMS. 4^{ème} édition. Algérie. 46-52.

Rapsang, G.F., Kumar, R., Joshi, S.R. (2013). Molecular and probiotic functional characterization of *Lactobacillus* spp. associated with traditionally fermented fish, Tungtap of Meghalaya in northeast India. *Proc Natl Acad Sci India Sec B Biol Sci*. 85:4.

Rapsang, G.F., Kumar, R., Joshi, S.R. (2011). Identification of *Lactobacillus pobuzihii* from tungtap: a traditionally fermented fish food, and analysis of its bacteriocinogenic potential. *Afr J Biotechnol* .10:12237-12243.

Rayman, M.K., Aris, B. et Hurst, A. (1981). Nisin: a possible alternative of adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 375-380.

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N. et Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews.* 4:124-140.

Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques AARN(Algerian Antimicrobial Resistance Network).16^{ème} rapport d'évaluation. (2015).

Rhoads, D.D., Wolcott ,R.D., Percival ,S.L. (2008). Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care.* 17(11):502–8.

Riley, M. A. et Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 7: 129-133.

Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., ... et Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes and new infections.* 6:22-29.

Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R.P. et Hill, C. (1998). Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ Microbiol.* 64: 2287-2290.

Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and environmental microbiology.* 62(2): 612-619.

Rybalchenko, O.V., Bondarenko, V.M., Orlova, O.G., Markov, A.G., Amasheh, A.S. (2015). Inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* on microbial growth and biofilm formation. *Archives of Microbiology.* 197: 1027–1032.

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

Saint-Hubert, C., Durieux, A., Bodo, E., Simon, J. P. (2009). Large scale purification protocol for carnocin KZ 213 from *Carnobacterium piscicola*. *Biotechnology letters.* 31(4):519-523.

Salman,J.A.S. et Khudair, A.Y.(2015).Antibacterial and antibiofilm effect of biosurfactant produced from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* against bacteria from catheters. *World Journal of Pharmaceutical Research .* 4 (10) : 320-333.

Salminen, S. et Von Wright, A. (1998). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., New York. 2nd ed.

Schillinger, U., Lücke, K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.

Schirru, S., Todorov, S. D., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., de Melo Franco, B. D. G. et Deiana, P. (2012). Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. Elsevier. *Food Control.* 25: 309-320.

Schleifer, K.-H. et Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol.* 18:461-467.

Schillinger, U., Lücke, K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.

Schirru, S., Todorov, S. D., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., de Melo Franco, B. D. G. et Deiana, P. (2012). Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. Elsevier. *Food Control.* 25: 309-320.

Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., and Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *J. Appl. Microbiol.* 120: 1449–1465.

Sezer, Ç., Güven, A. (2009). Investigation of Bacteriocin Production Capability of Lactic Acid Bacteria Isolated From Foods . Lafkas .Univ. Vet. Fak .Derg. 15(1): 45-50.

Silva, C.C.G., Silva, S.P.M. et Ribeiro, S.C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front. Microbiol.* 9: 594.

Simova, E. D., Beshkova, D. B., Dimitrov, Zh. P. (2009). Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 106: 692-701.

Smaoui, S., Elleuch, L., Bejar, W., Karray-Rebai, I., Ayadi, I., Jaouadi, B. et al. (2010). Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Appl Biochem Biotechnol.* 162:1132-1146

Sonar, N. R. et Halami, P. M. (2014). Phenotypic identification and technological attributes of native lactic acid bacteria present in fermented bamboo shoot products from North-East India. *Journal of Food Sciences and Technology.* 51(12) : 4143-4148.

Sparo, M.D., Castro, M.S., Andino, P.J., Lavigne, M.V., Ceriani, C., Gutierrez, G.L. et al. (2006). Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol.* 100:123-134.

- Stanckebrandt, E. et Teuber, M. (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*.70: 317-324.
- Strus,M., Gosiewski,T., Kochan,P. et Heczko,P.B. (2006).** "The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities." *FEMS Immuno. Medical Microbiol* .48 : 56- 63.
- Tankouic ,J. (2002).** Intoxication non médicamenteuses. Paris.425-429.
- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S. et Toba, T. (2001).** Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol*. 91:154-159.
- Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X.,LeBlanc, J. G., Franco, B. D. G. M. (2011).** Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (Carica papaya) - from isolation to application : characterization of a bacteriocin. *Food Res. Int.*.44: 1351-1363.
- Todorov, S. D., Nyati, H., Meincken,M. et Dicks,L.M.T. (2007).** Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *L. plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*. 18: 656-664.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2005).** Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol*. 45: 312-322.
- Todorov, S.D., Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T.(2004).** Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 50: 149-157.
- Toutou Sissoko, M. (2006).** Infections urinaires à Bamako : aspects épidémiologiques, bactériologiques et cliniques . Thèse pour obtenir le grade de octeur en pharmacie , Faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie , Université de Bamako Mali .77
- Tran, C. S., Rangel, S. M., Almblad, H., Kierbel, A., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., ...et Engel, J. N. (2014).** The *Pseudomonas aeruginosa* type III translocon is required for biofilm formation at the epithelial barrier. *PLoS Pathog*. 10(11).
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., Aziz, A. (2008).** Characterization of new bacterial biocontrol agents Acinetobacter, Bacillus, Pantoea and Pseudomonas spp. mediating grapevine resistance against Botrytis cinerea. *Environmental and Experimental Botany* 64 (1):21–32.
- Twomey , D., Ryan, M., Meaney , B., Hill, C.(2002).** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82: 165-185.
- Van Belkum, M. J., Kok, J.et Venema, G. (1992)** .Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin

plasmid p9B4-6. *Appl Environ Microbiol.*58: 572-577

Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. et Venema, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl Environ Microbiol.* 55:1187-1191.

Vandamme,P., Pot, B., Gillis,M.,de Vos,P., Kersters, K.,Swings, J. (1996)."Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics." *Microbiol Rev* .60 : 407-438.

Van der Meer, J.R., Polman, J., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. et Devos,W.M. (1993). Characterization of the *Lactococcus-lactis* nisin-a operon genes nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J Bacteriol.* 175:2578-2588.

Verheul ,A., Russell, N.J., Van T.H.R., Rombouts F.M. et Abee T. (1997). Modifications of membrane phospholipid composition in nisinresistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (9): 3451-7.

Vincent,J. (2000). Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux française :bilan et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d’Alerte d’Investigation et de surveillance des Infection Nosocomiales (RAISIN).

Vinod Kumar, J., Somesh, S. et Neerja, S. (2006). « Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables ». *Food technology and Biotechnology.* 44 (3):435- 439.

Vollenweider,S.(2004)."3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production." *Appl Microbiol Biotech.* 64 : 16-27.

Vos, P. et al.(2009). Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. 2e. Vol. 3. New York, NY: Springer-Verlag.

Vuotto, C., Longo, F. et Donelli, G. (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int J Oral Sci.* 6:189-194.

Waters, C. M. et Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria.*Annual Review of Cell Developmental Biology.* 21: 319–346.

Wescombe, P. A., Upton, M., Dierksen, K. P., Ragland, N. L., Sivabalan, S., Wirawan, R. E., ... et Tagg, J. R. (2006). Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Applied and environmental microbiology.*72(2):1459-1466.

- Wijaya, A., Neudeker, C., Holzapfel, W. et Franz, C. (2006).** Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. Proceedings of Food Microbiology, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy.124.
- Willey, J.M. et Van Der Donk,W.A. (2007).** "Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function." *Annu Rev Microbiol* .61 : 477–501.
- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. 51:221-271
- Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. et Stiles, M.E. (1995).** A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J Bacteriol*. 177:3143-3149.
- Wulijideligen, S., Asahina, T., Hara, K., Arakawa, K., Nakano, H. et Miyamoto, T. (2012).** Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag. *Animal Science Journal*. 83: 704–711.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E. et Drosinos, E.H. (2008).** Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. Elsevier. *Meat Science*. 80: 194-203.
- Yala , D., Merad, A.S., Mohamedi ,D. et OuarKorich M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91.
- Yateem, A., Balba, M.T., Al-Surrayai ,T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R .(2008).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci*. 3(4): 194-199.
- Zacharof, M.P. et Lovittb,R.W. (2012).**"Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria." Review Article APCBEE Procedia. 2: 50-56.
- Zalan,Z.,Barath, A. et Halasz, A. (2005).** "Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains." *Food Technol Biotech* .43: 219-225.
- Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P.C., Savu, L., Vatafu, I. et De Vuyst, L. (1999).** Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J Appl Microbiol*. 87:923-931.
- Zarour, K., Prieto, A., Pérez-Ramos, A., Kihal, M. et López, P. (2018).** Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L. mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products. *Journal of Functional Foods*.49:351-361.

Zergoug, A., Cheriguene, A., Chougrani, F. (2016). In Vitro antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's raw milk of Mostaganem (West Algeria) against Gram negative bacteria responsible for urinary tract infections. *South Asian Journal of Experimental Biology* .6(1): 15-22.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture

1. Milieu GN (Gélosenutritive)

Peptone	10 g
Extraitdeviande	4 g
Chloruredesodium	5 g
Agar	13 g
Eaudistilléeqsp	1000 ml

pH = 7,2

Sterilisation à 120°C pendant 20 minutes.

2. Milieu Desoxycholate- lactose-agar

Milieudéshydraté	40 g
Eaudistilléeqsp	1000 ml pH =7
Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes	

3. Milieu Bromothymol-blue- lactose-agar

Milieudéshydraté	41 g
Eaudistilléeqsp	1000 ml pH =7
Non autoclavable.	

4. Milieu MRS et MRSm (De Man *et al.*,1960)

	MRS agar	MRSm liquide
Peptone	10 g	-
Tryptone	-	10 g
Extrait de viande	10 g	5 g
Extrait de levure	5 g	5 g
Acétate de sodium	5 g	5 g
Phosphate dipotassique	2 g	2 g
Citrate d'ammonium	1 g	1 g
Sulfate de magnésium	0,1 g	0,1 g
Sulfate de manganèse	0,05 g	0,05 g
Glucose	20 g	20 g
Tween 80	1 ml	1 ml
Agar	15 g	-
Eau distillée qsp	1000 ml	-
	pH=6,5	
Tampon (Na ₂ /K, 0,2 M, pH7,0)	-	1000 ml

Sterilisation à 120°C pendant 20 minutes.

5. Milieu BHI (Brain Heart Infusion)

Infusion cerveau-cœur	10 g
Extrait de viande	17,5 g
Glucose	2 g
Phosphate disodique	2,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	18 g
Eau distillée qsp	1000 ml

L'infusion cerveau-cœur a été remplacée par la gélatine du pancréas digérée. Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

6. Milieu LB

Peptone	10 g
Extrait de levures	5 g
NaCl	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

7. Milieu TSA

Milieu déshydraté	40 g
Eau distillée qsp	1000 ml Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes

8. Milieu de Chapman

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g
pH=7,6	

9. Milieu Hektoen

Protease-peptone.....	12,0g
Extrait de levure.....	3,0g
Lactose.....	12,0g
Saccharose.....	12,0g
Salicin.....	2,0g
Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5g
Sels biliaire.....	9,0g
Fuschine acide.....	0,1g
Bleu de bromothymole.....	0,065g

Chlorure de sodium.....	5,0g
Thiosulfate de sodium.....	5,0g
Agar.....	13,0g

pH = 7.5

10. Gélose au Sang

Polypeptone	17,0g
Peptone pancréatique de coeur	3,0g
Extrait autolytique de levure.....	3,0g
Amidon de ma s	1,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Agar agar bactériologique.....	13,5g

pH =7,3 0,2.

11. Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de boeuf.....	300ml
Peptone de caséine.....	17.5g
Amidon de mais.....	1.5g
Agar.....	10.0g

pH= 7.4

.

Annexe 2

Préparation des enzymes dans des solutions tampons

1. Tampon phosphate Na_2/Na à 0,1M, pH 7, pour les enzymes trypsine, pronase E, protéinase K et la catalase:

Solution A = NaH_2PO_4 à 0,2M : dissoudre 27,8 g (139 g/mole) dans 1 litre d'eau distillée.

Solution B = Na_2HPO_4 à 0,2M : dissoudre 71,62 g (358,14 g/mole) dans 1 litre d'eau distillée.

Mélanger 39 ml de A et 61 ml de B, ajouter l'eau distillée pour un volume final de 200ml.

2. Tampon d'acide citrique à 0,05M, pH 2, pour la pepsine (Xiraphi *et al.*, 2006) : Dissoudre 0,21 g d'acide citrique dans 20 ml d'eau distillée. Vérifier le pH.

3. Tampon phosphate salin PBS

Pour préparer 1 L :

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
pH 7,4	

Mode opératoire de la galerie API 20E

1. Préparation de la galerie

Répartir un peu d'eau stérile dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

2. Préparation de l'inoculum:

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

3. Inoculation de la galerie

Ensemencer la galerie avec une pipette Pasteur stérile ouverte chargée en suspension, pointe posée sur un côté de la cupule, en laissant couler doucement la suspension dans la cupule. Tenir la boîte légèrement inclinée pour éviter la formation de bulles.

Pour les **caractères encadrés (CIT, VP, GEL)** : remplir entièrement le tube et la cupule

mise en aérobiose.

Pour les autres caractères, ne remplir que le tube.

Pour les **caractères soulignés (ADH, LDC, ODC, H₂S, URE)** : remplir la cupule avec de l'huile de paraffine stérile

Fermer la boîte et mettre à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

4. Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs.

5. Identification en utilisant le logiciel Apiweb (Biomerieux)

Un exemple de résultat obtenu est représenté ci-dessous.

- Ouverture de la page du logiciel Apiweb en choisissant le type de la galerie (API20E).

The screenshot shows the Apiweb software interface. On the left, there is a sidebar with a list of API galleries under the 'API' dropdown. The main area displays the 'API 20 E V4.1' test results. The results are organized into two rows of test tubes, each with four positions (1, 2, 4). The substrates tested are: ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H₂S, URE, TDA, IND, VP, GEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA, and OX. Below these, there are additional tests: NO₂, N₂, MOB, MeC, OF-O, and OF-F. A 'Valider' button is visible at the bottom right of the main area.

- Introduction des 7 chiffres dans les cases correspondantes. Puis valider.

The screenshot shows the Apiweb software interface with the same test results as the previous one, but with 7 digits entered in the corresponding boxes. The digits are: 3, 2, 6, 6, 1, 7, and 3. The 'Valider' button is still visible at the bottom right of the main area.

- Apparition
- de résultat sous forme d'un tableau indiquant le genre et l'espèce de la souche.

Fiche infections nosocomiales

Service de: Code:

Nom/Prénom:

Sexe F H Date d'entrée à l'hôpital: Date d'intervention: Date de prélèvement:

Facteur de risque:

Type d'intervention:

Prélèvement(s) sur:

Traitement antibiotérapeutique:

Germe(s) trouvé(s):

- Bacille Gram Gram - Cocci Gram Gram

Germe(s) identifié(s):

Sensibilité du germe aux:

.....

.....



REGULAR ARTICLE

Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from milk and traditional fermented dairy products of south Algeria against multidrug resistance pathogenic bacteria

Soumia Djelloul Daouadji^{*1}, Bouziane Abbouni¹, M'hamed Bouricha², Mohamed Lamine Benine¹, Khedoudja Kanoun¹, Amina Khaldi¹

¹Laboratory of Molecular Microbiology Proteomics and Health, Department of Biology, Faculty of Natural Science and Life, University of Djillali Liabes Sidi Bel Abbes, Algeria

²Department of Biology, Faculty of Natural Science and Life, University of Kasdi Merbah Ouargla, Algeria

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 7 Jul 2020

Revised: 24 Aug 2020

Accepted: 25 Aug 2020

*Corresponding Author:

Email: daouadjisoumia@yahoo.fr

Telephone: +213554957942

Keywords: Multidrug resistance- dairy products- lactic acid bacteria- antibacterial activity- cell-free supernatant- Bacteriocin-like

ABSTRACT

The alarming situation of the increasing problem of the antibiotics resistance in the whole world requires an immediate need of the exploration of better alternatives for combating resistance. The main aim of the present work was the isolation and the screening of large range of lactic acid bacteria with important potential of antibacterial activity against multidrug resistance pathogenic strains and the characterization of the molecules responsible for antibacterial activity. The primary screening indicated the isolation of total of 200 lactic acid bacteria (LAB) from harvested milk (camel and goat) and traditional fermented dairy products (Jben and kamaria) of south Algeria and investigated for their antibacterial activity against clinical pathogens bacteria. Furthermore, Nineteen representative isolates (19) were selected and characterized with regard to their functional properties. The obtained results indicated that produced bacteriocin by both bacterial strains *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 has manifested an excellent antagonistic activity against *P. aeruginosa* (PA) and *Staphylococcus aureus* (MRSA), which was Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). A Further investigation indicated that the produced bacteriocin by LAB9 and LAB 13 were heat stable, where their inactivation was observed when treated with pepsin and trypsin. Additionally, the purification of the produced bacteriocin by *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 has been achieved by the using of the partial ammonium sulfate precipitation. The technological properties and the stability of bacteriocins of LAB may lead for bioprospection of antibacterial components in the current struggle against increasing pandrug resistance and slowing down the expansion of multi-drug resistance.

1. Introduction

The bacterial antibiotic resistance pose a serious problem for a global public health., where the abu-

sive use of antibiotics accelerates the process of appearance of antibiotic-resistant bacterial strains (Zhang et al., 2015). Recently, the increased antibiotic resistance has encouraged the scientific

searchers to investigate a new alternative therapeutic option by use of several compounds with antibacterial property such as plant compounds, bacteriophages and potential bactericidal compounds against multi-resistance (MDR) pathogenic bacterial strains (Singh et al., 2010 ; Holmes et al., 2016).

The lactic acid bacteria (LAB) present in different ecological system such as milk and dairy products, meat and meat products cereals, plants, which was characterized by their antibacterial activity towards many pathogenic microorganisms, due the presence of the important molecules like organic acids, diacetyl, hydrogen peroxide, acetoin, 2,3- butanediol, acetaldehyde, benzoate, bacteriolytic enzymes, bacteriocin, reuterin, etc... (Mayo et al., 2010). Therefore, the production of bacteriocin by the LAB has received more attention and has interested many searchers (Bekuma and Ahmed, 2018).

The produced bacteriocins by LAB were ribosomal synthesized proteins or protein complexes were characterized with a low toxicity and high antagonistic activity against multi-resistance pathogenic bacterial strains (MDR) (Collins et al., 2010). Furthermore, the cationic amphiphiles properties and the heat stability of the produced bacteriocins by LAB were applied as potential inhibitory against pathogenic strains of *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella* and *Listeria* (Rapsang and Joshi, 2015).

Lactic Acid Bacteria (LAB) present in raw camel's milk has induced additional inhibitory effect against pathogenic bacteria, while the characterization of the molecules responsible for antibacterial activity has been reported in few studies (Benmechernene et al., 2013 ; Zarour et al., 2018; Mokdad et al., 2020).

Several studies have focused on the identification of indigenous LABs isolated from Algerian artisanal dairy products (Meghoufel et al., 2017; Ait Ab-deslam et al., 2019). In Algeria, no much work has been done on the investigation of their antagonist activity against multiresistant bacterial strains. This study was carried out on the isolation and screening of a wide range of indigenous lactic acid bacteria from raw milk (camel and goat) and traditional fermented dairy products (Jben and kamaria) from southern Algeria for their antagonist activity against MDR pathogens and clinical isolates.

2. Materials and Methods

Sample of collection

A total of 25 samples of camel milk, goat's milk, traditional cheeses (Jben and kamaria), were collected in three different regions (Hassi Ben Abdallah, Elbour, Taibet) in the province of Ouargla located in the south-east from Algeria and immediately transported under refrigeration at 4 ° C until delivery to the laboratory for further analysis.. For the sample collection of camel milk, goat's milk, the udder of goat was washed twice with sterilized water and disinfected with 70% ethanol.

For the solid samples of (Jben and Kamaria), 1 g of each sample was added to a volume 9 ml of sterile solution, which was composed of (0.1% peptone, 0.85% NaCl) and homogenized by using vortex mixing. While, the liquid samples (milk), a volume 1 ml of sample was added to 9 ml sterile and homogenized by vortex mixing.

Phenotypic characterization of LAB strains

The total viable LAB counts in each sample was analyzed by spread plating the serially diluted samples on De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar. The isolation of LAB has been achieved by the inoculation on the MRS culture medium and the incubation at 30°C for 48-72 hours. After that a colonies were randomly picked up from the plates contained less than 10 colonies (Leisner et al., 1997).

The selected colonies were checked by streaking on the fresh agar plates (Moulay et al., 2013), followed by macroscopic and microscopic examination.

Finally, the obtained strains presented a general characteristic of lactic acid bacteria were chosen from each plate for further characterization. The isolated strains were routinely propagated on the culture medium, supplemented with 10% glycerol and stored at a temperature of -20°C according to the described protocol by (Kihal et al., 2007) and the used culture were sub-cultured twice (1% inoculum, 24 h, 30°C).

Cell morphology and mobility of the isolated lactic acid bacteria were firstly observed by using a phase contrast microscope according to the described method by Harrigan (1998) and explored by Gram stain and by catalase activity.

Presumptive colonies of LAB were investigated by their growth at different temperatures (10, 15 , 45° C), at several pH values of the M17 and MRS culture medium (3.9 and 9.6) and in the presence

different concentrations of NaCl (6.5, 10, 18 %). Whereas, gas and acetoin production from glucose has been achieved according to the as described method by Schillinger and Lücke and the using the Voges-Proskauer test (Dykes et al., 1994) and arginin hydrolysis explored by the adding of bromocresol purple and acetoin production (Zourari et al., 1991).

The profile of sugar fermentation was carried out on both M17 and MRS culture medium in the absence of glucose and meat extract, in the presence bromocresol purple and phenol red respectively as pH indicator, and supplemented with 10 g/1(w/v) of the following carbohydrates : glucose, galactose, lactose, maltose, sorbitol, fructose, mannane (Sigma). Furthermore, for anaerobic conditions each tube was covered with two drops of sterile liquid paraffin after incubation and the phenotypic characterization were conducted twice for each strain.

The homofermentative bacterial cells grouped in pairs or short chains, grown at (15, 40 and 45°C) respectively, and survived a heating at 60°C after 30 min were identified as *Enterococci* (Devriese et al., 1987).

Whereas, the genus of *Leuconostoc* was identified according to the described protocol by Garvie and co-workers (1986). The isolates were further inoculated in solid culture medium MRS or M17, incubated at 45°C and the harvested biomass by centrifugation was supplemented with 10% glycerol and stored at a temperature of -20°C.

Used bacteria

The used bacterial strains in this work (*Escherichia coli* ATCC25992 and *Salmonella typhi* ATCC14028) were obtained from Pasteur Institute of Algiers. The clinical pathogens bacteria included both Gram negativ: *Klebsiella pneumonia* (KP72), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) and *Acinetobacter baumannii* (AB3) and Gram positive strains :Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA9), *Streptococcus pneumonia* (SP421), *Enterococcus faecalis* (EF32) were collected from patients in intensive care unit of E.H.U. Ouargla (SouthAlgeria).

Screening of LAB for antibacterial activity

At first, the isolated, selected LAB were investigated for their ability to produce antibacterial substances by using the spot agar test (Fleming et al., 1975). For this purpose, a volume 3 µl of the grown

selected LAB on liquid MRS culture medium, was spotted onto the surface of MRS solid culture medium, incubated at 37°C 24 hours and the grown colonies were then overlaid with a volume 10 ml of Mueller Hinton soft agar culture medium, which was inoculated with 10⁸ CFU/ml. After that, the plates were incubated overnight at 37°C and the diameter of inhibition zone was measured. A positive Inhibition was recorded when the diameter of the formed clear zone around the colonies was more than 2 mm.

Bacteriocin production and activity

The isolated colonies were inoculated in a volume of 50 ml MRS broth, incubated at 37°C for 24 hours. The biomass has been harvested by centrifugation at 15,000 rpm for 10 min at 4°C, where a portion of the cell-free supernatant was neutralized with 1 M NaOH (pH 6.8 ± 0.2), filtered, sterilized through a 0.45 µm Millipore, to reduce the effect organic acids such as acid of lactic acid, the pH as antibacterial compounds (Sigma-Aldrich, Germany) (Singh et al., 2010).

a volume of 100 µl of each overnight grown culture in a MRS broth was inoculated, spread on the solid Muller-Hinton culture medium with the help of spreader. A sterile cork borer of diameter 3.0 mm was used to bore wells in center of inoculated solid culture medium of Muller-Hinton. Subsequently, a volume 100 µl of culture supernatant of the selected producing bacteriocin strains was introduced in well. After that, plates were kept at 4°C for 2 hours and then incubated at 37°C for 24 hours.

The antagonistic activity was evaluated by measuring the diameter of the formed zone of inhibition around the wells. The bacterial isolate showing the widest zone of inhibition against clinical pathogen bacteria was selected for further studies (Thompson et al., 1996).

Partial purification of bacteriocin

The selected producing bacteriocin LAB with a highest antagonistic activity was inoculated in the MRS culture medium, incubated at 37°C for 24 hours and harvested by centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The recuperated supernatant was used for the partial purification of bacteriocin. For this purpose, different concentrations of ammonium sulfate were added to the crude extract with moderate agitation on a magnetic stirrer and kept at 4°C over 48 hours.

The obtained precipitates were collected by centrifugation at 12,000 x g for 10 min, the resulting pellet produced bacteriocins by the producing bacteriocins selected LAB, has been assayed. For this purpose, phosphate buffer, adjusted at pH-value of pH 7, *P. aeruginosa* was inoculated in the MRS culture medium with initial optical density of 0.5 at 625 nm according the protocol described by Abouni and coworkers(2015). comparison with the crude bacteriocin (Kittikun et al., 2015).

Effect of temperature on bacteriocin stability

The exploration of the effect of temperature on bacteriocin stability, a volume of 200 ml of the neutralized cell-free supernatant were heated at different temperature (60, 70, 90 and 110°C) for 30 min. The heat-treated bacteriocin samples were tested for antibacterial activity against clinical pathogen bacteria according to the earlier described protocol by Allouache et al.(2010).

Effect of enzyme on bacteriocin activity

The exploration of the effect of enzyme on bacteriocin activity was carried out by the treatment with proteolytic enzymes such as pepsin and trypsin. For this purpose, proteolytic enzymes (pepsin, trypsin) at a final concentration of 1 mg/ml was added to a volume of 200 µl of the cell-free supernatant, adjusted at pH-value of 6.5. Furthermore, the reaction was started by the incubation of the treated samples at 37°C for 6 hours and stopped by boiling at 100°C for 5 min and the untreated cell-free supernatant was used as control. The antibacterial activity of the treated and untreated supernatant was determined by agar well-diffusion according the above-mentioned protocol and by using the selected indicator strains (Biswas et al.,2017).

Study of *P. aeruginosa* growth in the presence of the produced bacteriocins

In order to explore the mode of action of the producing bacteriocins selected LAB against *P. aeruginosa*, the viability of the treated cells has been investigated. The bacterial growth of *P. aeruginosa*

A volume of 1 ml of the recovered of the producing bacteriocins selected LAB, was added 5 hours after the onset of the bacterial growth. After that, samples were withdrawn from the culture and used for determination for the optical density at 625 nm, extracellular pH, and determination of the antibacterial activity (Ghanbari et al.,2013).

3. Results

Morphological and biochemical characterization of the isolates

200 lactic acid bacteria isolated from 25 sample of milk (camel and goat) and traditional cheeses (Jben and kamaria) were primary identified on the basis of Gram staining, morphology and catalase activity.

The morphological study of the isolated bacterial stains indicated the presence of the cocci, which were organized in pairs or long chains with a positive Gram staining with negative catalase activity. Whereas, the morphological and physiologic characteristics of the isolates were presented in (table 1,2).

Antibacterial assay

A total of 200 isolates were obtained and screened for antibacterial activity against Gram positive and negative clinical pathogen bacteria by using the agar spot method. The used screening of the producing bacteriocin LAB with important potential antibacterial activity against clinical pathogen bacteria revealed the isolation of 19 bacterial strains (9.5%), (Table 3, Figure 1). The obtained results indicated that the measured average diameter of the inhibition zone was around 8-26 mm with different inhibitory effects towards clinical pathogen bacteria.

Macromorphology	Micromorphology	Fermentation type	Group	Number of isolates
Round white colonies	Cocci in pairs and short chains	homofermentative	<i>Lactococcus</i>	9
Small, round transparent colonies	Cocci in chain	heterofermentative	<i>Leuconostoc</i>	6
Round white colonies	Cocci in chain	homofermentative	<i>Enterococcus</i>	3
Small, round transparent colonies	irregular rods	homofermentative	<i>Weissella</i>	1

Table 1: Morphology of lactic acid bacteria strains.

Strains	pH at 9.6	NaCl				Temperature					Fermentation profile						
		2	3	4	6.5	10	15	30	37	45	Gl	Lac	Gal	Sor	Fr	Man	M
LAB1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LAB2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LAB3	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LAB4	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LAB5	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LAB6	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
LAB7	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
LAB8	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
LAB9	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
LAB10	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
LAB11	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
LAB12	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
LAB13	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
LAB14	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
LAB15	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
LAB16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+/	-	-	-
LAB17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+/	-	-	-
LAB18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+/	-	-	-
LAB19	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+/	+/	+	-

Table 2: Physiological tests and fermentation profile of the isolated lactic acid bacteria from milk and fermented milk products.

+: Positive reaction, -: Negative reaction, +/-: variable reaction

Isolated bacterial LAB	Code	Inhibitory effect of the isolated antagonistic lactic acid bacteria against pathogen bacterial							
		<i>E.coli</i> ATCC25992	<i>S. typhi</i> ATCC14028	KP72	PA	AB3	MR SA9	SP4 21	EF 32
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB1	20	12	13	20	11	19	15	18
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB2	20	09	00	22	00	21	10	20
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB3	13	00	00	17	00	18	25	12
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB4	12	10	08	14	10	14	11	14
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	LAB5	22	00	10	21	11	16	13	15
<i>Lactococcus lactis</i>	LAB6	12	00	00	12	10	20	13	14
<i>Lactococcus lactis</i>	LAB7	18	00	10	14	11	14	10	12
<i>Lactococcus lactis</i>	LAB 8	20	00	12	15	11	20	12	11
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	LAB 9	20	23	18	15	09	20	17	26
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	LAB 10	12	00	10	18	14	18	12	14
<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	LAB 11	21	10	17	20	12	20	11	13
<i>L. mesenteroide subsp crémoris</i>	LAB 12	15	08	13	20	11	21	20	16
<i>L. mesenteroide subsp crémoris</i>	LAB 13	14	20	11	26	10	21	12	12
<i>Leuconostoc lactis</i>	LAB 14	15	00	00	10	08	11	10	12
<i>Leuconostoc sp</i>	LAB 15	17	00	14	19	00	16	19	11
<i>Entéroccoccus durans</i>	LAB 16	20	00	00	14	14	22	17	12
<i>Entéroccoccus durans</i>	LAB 17	14	00	00	13	00	22	15	17
<i>Entéroccoccus durans</i>	LAB18	17	10	18	20	11	22	20	18
<i>Weissella sp</i>	LAB 19	12	00	00	11	00	18	10	10

Table 3: Illustration of the inhibitory effect of the isolated

antagonistic lactic acid bacteria (LAB1, LAB2, LAB3, LAB4, LAB5, LAB6, LAB7, LAB8, LAB9, LAB10, LAB11, LAB11, LAB12, LAB13, LAB14, LAB15, LAB16, LAB17, LAB18, LAB19) against pathogen bacterial *E. coli* ATCC25992 and *S. typhi* ATCC14028, KP7, PA, AB3, MRSA9, SP421, EF 32.(KP72): *Klebsiella pneumoniae*, (PA): *Pseudomonas aeruginosa*, (AB3): *Acinetobacter baumannii*, (MRS A9): *Staphylococcus aureus*, (SP421): *Streptococcus pneumonia*, (EF 32): *Enterococcus faecalis*

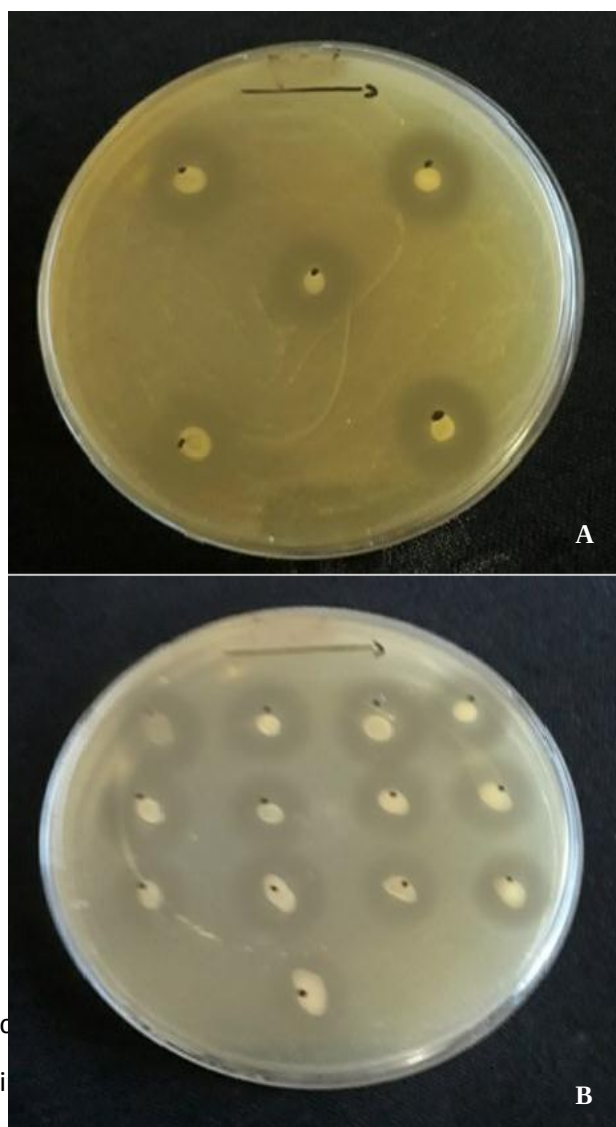


Figure 1: Antibacterial activity of the isolated lactic acid bacteria against such pathogen bacterial growth of *S. typhi* ATCC14028 (A) and *S. aureus* MRSA9 (B) by the using agar diffusion method, inoculated on the MRS solid culture medium, incubated at temperature of 30°C for 24 hours.

A first, the isolated, selected LAB, *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 has manifested a excellent inhibition zones against a clinical pathogen bacteria.

Furthermore, the isolated, selected LAB9 and LAB 13 induced a drastically loss of antibacterial activity, showed the highest antibacterial activity against *E. faecalis* (EF32) *P. aeruginosa* (PA) with a diameter of zone of inhibition (26 mm).

Partial purification of bacteriocins

The supernatant of the isolated, selected producing *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 in bacteriocins *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc* MRS culture medium was stable after heat treatment *mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13, inoculated on at different temperatures (60, 70, 90 and 110°C) for MRS culture medium was recuperated by cen-

30 min (Table4).
trifugation and used purification of bacteriocin. A Partial purification of bacteriocin has been used by adding 50% ammonium sulfate to the harvested

precipitates by centrifugation was resolved in 1M Potassium phosphate buffer, adjusted pH-value pH 7.0.

The obtained results have indicated that the anti- bacterial activity bacteria against pathogenic bacteria has been considerably augmented. The partial purified bacteriocin with (50%) ammonium sulphate saturation, produced by *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 has manifested a important antibacterial activity against *E. coli* ATCC25992, *S. typhi* ATCC14028, *S. aureus* (MRSA9), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), where a diameter of inhibition zone were considerably

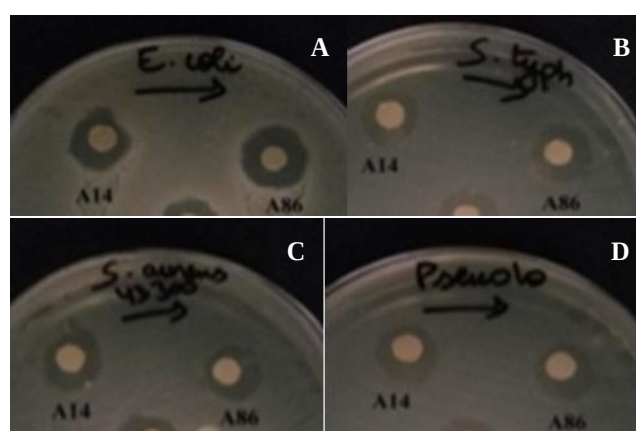


Figure 2: Antibacterial activity of the isolated Lactic acid bacteria *Lactococcus raffinolactis* (A14), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (A86) by the using of the precipitated of ammonium sulfate, dialyzed supernatant against pathogen bacterial : (a) *E. coli* ATCC25992 ; (b) *S. typhi* ATCC14028; (c) *S. aureus* (MRSA9) ; (d) *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Effect of enzymes and temperature on antibacterial activities

The treatment of supernatant of the isolated, selected producing bacteriocins *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 with proteolytic enzymes such as trypsin, pepsin has induced a drastically loss of antibacterial activity, which was explained by protein nature of the antibacterial compound. Furthermore, the antibacterial activity of the containing molecules in supernatant of the inoculated *L. raffinolactis* LAB9 and

Leuconostoc MRS culture medium was stable after heat treatment *mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13, inoculated on at different temperatures (60, 70, 90 and 110°C) for MRS culture medium was recuperated by cen-

Bacterial growth and bacteriocin production

The effect of the produced bacteriocin activity by LAB9 and LAB13 against *E. coli* ATCC25992, *S. typhi*

Bacteriocins producer strain	Resistance to heat at temperature in (30 min)				Sensitivity to proteolytic activity	
	60 °C	70 °C	90 °C	110 °C	Pepsin	Trypsin
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	R	R	R	R	S	S
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	R	R	R	R	S	S

Table 4: Effect of heated, purified bacteriocins produced, by *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* respectively against pathogen bacterial growth *E.coli*ATCC25992.

R: Resistant bacteriocin activity; S: Sensitive bacteriocin activity.

ATCC14028, *S. aureus* (MRSA9), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) was evaluated by the production of the bacterial biomass. For this purpose, the pathogenic (PA), in comparison with the untreated biomass bacteria *P. aeruginosa* (PA) was inoculated in the MRS liquid culture medium, with initial optical density of 0.5 at wave length of 625 nm, incubated at temperature of 30°C for 24 hours and a volume of 1 ml of the produced bacteriocins by LAB9 and LAB13 was added 5 hours after the onset of the bacterial growth.

The obtained results (Figure 3, 4) showed a considerable inhibition of the growth *P. aeruginosa* (PA), after the adding a volume 1 ml of the produced bacteriocins LAB9 and LAB13, to the culture medium of the above tested strain during early exponential growth phase, which was explained by bacterial lysis of *P. aeruginosa* (PA) in the presence of the produced bacteriocin by (LAB9 and LAB13), which has induced unbalanced growth, and more over the arrest of the cell cycle of *P. aeruginosa*

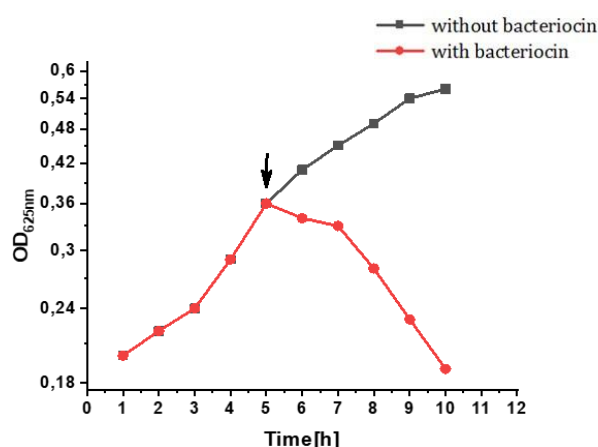


Figure 3: Bacterial growth of *P. aeruginosa* (PA) in the absence and the presence of the cell-free supernatants (CFS) produced by) of LAB 9, inoculated in the MRS liquid culture medium, incubated at temperature of 30°C for 24 hours.

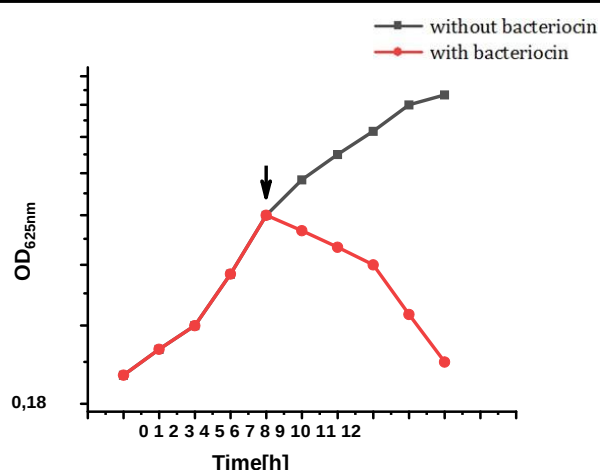


Figure 4: Bacterial growth of *P. aeruginosa* (PA) in the absence and the presence of the cell-free supernatants (CFS) produced by) of LAB 13, inoculated in the MRS liquid culture medium, incubated at temperature of 30°C for 24 hours.

4. Discussion

The occurrence of a rapid emergence of bacterial resistance threat the longevity of antibiotics. Furthermore, the nosocomial infections caused by multidrug resistant Gram-negative pathogens bacteria presented as a major burden to both patients and healthcare systems, which was accompanied with increased annual mortality (Meade et al., 2020). The produced bacteriocin by LAB has explored a huge potential as food preservatives and the production for next generation antibiotics, which can be used as target for the MDR pathogens (Perez et al., 2014 ; Holt et al., 2013).

In the present work, LAB were isolated milk and traditionally fermented dairy, explored for their potential production of bacteriocins, which was used for inhibition of clinical isolates growth of Gram-negative bacilli and positive cocci. Algerian raw camel's and goat's milk were widely consumed in southern Algeria regions because of their high nutritional, medicinal value and their protective activities. Several studies have focused on the inhibition of pathogenic bacteria by protective proteins present in camel and goat milks (Benmecherrhene et al., 2013; Zarour et al., 2018 ; Mokdad et al., 2020).

The obtained results indicated that 9.5 % (19 of 200 isolates) has produced bacteriocin-like, which has considerably reduced the growth of the investigated clinical pathogen bacteria. Biswas and co-workers (2017) has reported that 13% (11 of 84

isolates) were able to produce bacteriocin, whereas, Sezer and Güven (2009) has showed that only 35 LAB isolates from milk and meat products has exhibited antibacterial activity from a total of 12,700 bacterial strains.

Furthermore, Zergoug and co-workers (2016) reported that only 10 out of all 40 LAB isolated from goat's raw milk showed inhibition against uropathogens. The investigated antibacterial activity of the LAB isolates against MDR bacterial growth has indicated that among 19 isolates, only 2 bacterial strains has manifested important inhibition and used for further characterization. Both bacterial strains *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 were excellent candidates for inhibition of various Gram-positive and negative bacteria.

Mokdad et al. (2020) has reported that *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* has showed a important potential for inhibition of pathogens bacteria such as *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *S. aureus*, *B. thermosphacta*, *M. luteus*, *L. sakei*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

The inhibition effects the produced bacteriocin by *L. mesenteroides* against other Gram-positive pathogens, as *B. thermosphacta*, *S. aureus*, *M. luteus*, and Gram-negative pathogens, as *E. coli* and *P. aeruginosa* have been already described by (Asahina et al., 2012; Arakawa et al., 2016; Bellil et al., 2018).

The produced bacteriocins by *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 were purified with partial ammonium sulfate precipitation, dialyzed and washed with water.

The investigated antibacterial activity of bacteriocin after purification process was considerably increased.

The bacteriocins were insoluble in water, whereas, and the impurities were soluble in water. Therefore, they were easily removed (Gautam and Sharma, 2009).

The obtained result indicated that *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 have manifested a important potential for antibacterial substances production, which can be viable alternative to antibiotics to treat the pandrug-resistant bacteria.

Furthermore, Maurya and Thakur (2012) has reported a similar results for antibacterial activity of

bacteriocin produced by *Leuconostoc NT-1*, after their partial purification and their characterization of the effect of some physical and chemical factors against several pathogenic and spoilage-causing bacteria.

The antibacterial activity of bacteriocin were even against some potential pathogen bacteria such as *S. aureus*, a methicillin-resistant *S. aureus*, *Salmonella typhi* and *Klebsiella pneumonia* (Maurya and Thakur, 2012).

A further physio-chemical characterization of the cell-free supernatant was used by the treatment of the produced bacteriocin by *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 with different enzymes and at different temperature.

The treatment of the bacteriocin with various proteolytic enzymes such as trypsin, pepsin has induced a lost of the antibacterial activity, which has explained by the proteinaceous nature of the compounds. The treatment of the supernatant at different temperatures (60, 70, 90, 110°C) and the exploration of their antibacterial activity indicated that MDR inhibition was occurred even after heating at 100°C, which means the thermostability of bacteriocin.

The thermostability and pH stability of the bacteriocins constitute useful characteristics for application in food and drug processing (Ahmadova et al., 2013). The antibacterial activity of the produced bacteriocins by *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 has been achieved according to the described method of Barefoot (Barefoot and Klaenhammer, 1983).

The supplemented supernatant of *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* to the inoculated a clinical pathogenic bacteria after 5 hours on the onset of fermentation has caused a drastically decrease of bacterial growth, which was measured by the measurement of the optical density.

In early study, Rodríguez et al. (2000) has reported that bacterial growth of *Staphylococcus aureus* was decreased after a few hours on the onset of fermentation and the adding supernatant of the *Lactococcus lactis*.

Finally, the prevalence of the produced bacteriocin by *L. raffinolactis* in dairy foods could be used as alternative pharmaceutical compounds with prom-

ising therapeutic, a little knowledge was available about this molecule.

5. Conclusion

In the present study, the produced bacteriocin by lactic acid bacteria isolated from milk (camel and goat) and traditional fermented dairy products (Jben, kamaria) from south region of Algeria has manifested a antagonistic activity against a wide spectrum of MDR, which has explained the importance of this bacterial group in human health.

In fact that the isolated *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 has indicated an excellent antibacterial activity against clinical pathogens bacteria and the exploration of the produced purified bacteriocins as potent molecule to fight against nosocomial infections in hospital environment, the dissemination of antibiotic-resistant pathogens bacteria, appear to pose a serious problem of public health.

Furthermore, understanding of the mechanisms of antibiotic resistance will be urgently required to mitigate health public preoccupation. Alternative therapeutic application of bacteriocin has become helpful tool due to its multifunctional properties. Furthermore, it would be of interest to find out which functional group is responsible for the antagonistic activity of the produced bacteriocin by *L. raffinolactis* LAB9 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* LAB13 and also whether any of them is a novel compound with antagonistic activity which would make it a promising candidate for the production of new antimicrobials.

However, further work is needed to fully understand the molecular mechanisms of bacteriocins, structure-function relationships, and testing their cytotoxic effects and validating safety under in vitro and in vivo models.

Acknowledgements

We are thankful to the department head of the bacteriology laboratory of hospital of Ouargla Dr. Kourim Meghnia for providing us with the bacterial strains and for her encouragement. We would like to thank Prof. Dr. MEDAH Boumediene, for his support and his useful discussion. Without the kind cooperation of the above mentioned people the work could not have been possible.

Abbouni B, Mekri M, Tifrit A, Larbi Daoudji K, Doumandji A (2015) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk against spoilage and pathogenic bacteria. *Global Veterinaria* 15 (5):485-492

Ait Abdeslam A, Desmaures N, Bensoltane A (2019) Identification of indigenous *Lactobacillus* isolated from artisanal Algerian dairy product by 16S rRNA Gene Sequencing and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *South Asian Journal of Experimental Biology* 9(5) : 193- 206

Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Mirhadi Zadi T, Kuliyeu A, Franco BDG de M, Chobert J-M, Haertlé T (2013) Evaluation of antibacterial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30(2): 631-641

Allouache F, Hellal A, Laraba A (2010) Study of the antibacterial activity of *thermophilic lactobacilli* strains used in the dairy industry. *Nature Et Technologie* 3: 13-20

Arakawa K, Yoshida S, Aikawa H, Hano C, Bolormaa T, Burenjargal S, Miyamoto T (2016) Production of a bacteriocin-like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 isolated from Mongolian fermented mare milk, airag. *Animal Science Journal* 87(3):449-456

Asahina T, Hara K, Arakawa K, Nakano H, Miyamoto T (2012) Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag. *Animal Science Journal* 83(10): 704-711

Barefoot S, Klaenhammer T(1983) Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus Acidophilus*. *Applied and environmental microbiology* 45(6): 1808-15

Bekuma A, Ahmed WM (2018) Biopreservation, Promising Strategies to Improve the safety and Shelf-Life of Foods: A review. *International Journal of Microbiological Research* 9 (3): 76-80

Bellil Y, Benmechene Z, Bellil WC, Kihal M (2018) Antibacterial and antibiofilm activity of the bacteriocin-producing strain *Leuconostoc mesenteroides* CHBY46 isolated from Algerian dromedary milk against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *South Asian Journal of Experimental Biology* 8(4): 120- 131

Benmechene Z, Chentouf HF, Yahia B, Fatima G, Quintela-Balaja M, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J (2013) Technological Aptitude and Applications of *Leuconostoc mesenteroides* Bioactive Strains Isolated from Algerian Raw Camel Milk. *BioMed Research International* 2013:1-14

Biswas K, Upadhyay S, Rapsang GF, Joshi SR (2017) Antibacterial and Synergistic Activity Against β -Lactamase-Producing Nosocomial Bacteria by Bacteriocin of LAB Isolated From Lesser Known Traditionally Fermented Products of India. *HAYATI Journal of Biosciences* 24(2): 87-95

Collins B, Curtis N, Cotter PD, Hill C, Ross RP (2010) The ABC Transporter AnrAB Contributes to the Innate Resistance of *Listeria monocytogenes* to Nisin, Bacitracin, and Various β -Lactam Antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(10): 4416-4423

Devriese LA, Van De Kerckhove A, Kilpper-Balz R, Schleifer KH (1987) Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(3): 257-259

Dykes GA, Britz TJ, Von Holy A (1994) Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged Vienna sausages. *Journal of Applied Bacteriology* 76(3):

References

- Fleming HP, Etchells JL, Costilow RN (1975) Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines. *Applied Microbiology* 30(6): 1040-1042
- Garvie EI (1986) Genus *Leuconostoc*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 9th edition, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA 1071-1075.
- Gautam N, Sharma N (2009) Purification and characterization of bacteriocin produced by strain of *Lactobacillus brevis* MTCC 7539. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 46(4): 337-341
- Harrigan WF (1998) *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3rd ed. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 43-70
- Ghanbari M, Jami M, Kneifel W, Domig KJ (2013). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Food Control* 32(2):379-385
- H-Kittikun A, Biscola V, El-Ghaish S, Jaffrès E, Dousset X, Pillot G, Haertlé T, Chobert J-M, Hwanhlem N (2015) Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. *Food Control* 54: 126-134
- Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJV (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antibacterial resistance. *The Lancet* 387 (10014):176-187
- Holt KE, Thieu Nga TV, Thanh DP, Vinh H, Kim DW, Vu Tra MP, Campbell JI, Hoang NV, Vinh NT, Minh PV, Thuy CT, Nga TT, Thompson C, Dung TT, Nhu NT, Vinh PV, Tuyet PT, Phuc HL, Lien NT, Phu BD, Ai NT, Tien NM, Dong N, Parry CM, Hien TT, Farrar JJ, Parkhill J, Dougan G, Thomson NR, Baker S (2013) Tracking the establishment of local endemic populations of an emergent enteric pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (43) : 17522-17527
- Hurst A (1981) Nisin. *Advances in Applied Microbiology* 27:85-123
- Kihal M, Prevost H, Henni DE, Benmechene Z, Diviès C (2007) Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides* Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2 (2):62-68
- Leisner J, Rusul G, Wee B, Boo H, Muhammad K (1997) Microbiology of Chili Bo, a Popular Malaysian Food Ingredient. *Journal of Food Protection* 60(10):1235-1240
- Maurya AP, Thakur RL (2012) Inhibition spectrum, purification and characterization of bacteriocin from *Leuconostoc* NT-1. *Current Science* 103(12): 1405-1407
- Mayo B, Aleksandrak-Piekarczyk T, Fernández M, Kowalczyk M, Álvarez-Martín P, Bardowski J (2010) Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications* : 3-33
- Meade E, Slattery MA, Garvey M (2020) Bacteriocins, Potent Antibacterial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics* 9(1): 32
- Meghoue Homrani A, Nemmiche S Benkrizi N, Dahou A, Zbala R (2018) A brief identification of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk by MALDI-TOF MS. *South Asian Journal of Experimental Biology* 7(4) : 157-165
- Mokdad FH, Benmechene Z, Benyoucef A, Russo N, Randazzo CL, Caggia C, Kihal M (2020) Characterization of bioactive *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin strains isolated from camel's and goat's Algerian raw milks. *Ponte* 76(3) :32-61
- Moulay M, Benlahcen K, Aggad H, Kihal M (2013) Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk. *Advances in Environmental Biology* 7(6): 999-1007
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial cell factories* 13(S1):1-13
- Rapsang GF, Joshi SR (2015) Molecular and Probiotic Functional Characterization of *Lactobacillus* spp. Associated with Traditionally Fermented Fish, *Tungtap* of Meghalaya in Northeast India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 85(4) :923-933
- Rodríguez E, González B, Gaya P, Nuñez M, Medina M (2000) Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10 (1-2): 7-15
- Rodríguez E, Arqués JL, Rodríguez R, Peirotén Á, Landete JM, Medina M (2012). Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *Journal of Functional Foods* 4(2):542-551
- Sezer Ç, Güven A Investigation of Bacteriocin Production Capability of Lactic Acid Bacteria Isolated From Foods (2009) . *Lafkas .Univ. Vet. Fak .Derg* 15(1): 45-50
- Singh RK, Upadhyay S, Tiwari SP, Rai AK, Mohapatra TM (2010) Screening of cyanobacterial extracts against bacteria causing nosocomial infection. *Journal of Pharmacy Research* 3(9): 2096-2098
- Thompson JK, Collins MA, Mercer WD (1996) Characterization of a proteinaceous antibacterial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *The Journal of applied bacteriology* 80(3): 338-48
- Zarour K, Prieto A, Pérez-Ramos A, Kihal M, López P (2018) Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L. mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products. *Journal of Functional Foods* 49: 351-361
- Zhang QQ, Ying GG, Pan CG, Liu YS, Zhao JL (2015) Comprehensive Evaluation of Antibiotics Emission and Fate in the River Basins of China: Source Analysis, Multimedia Modeling, and Linkage to Bacterial Resistance. *Environmental science & technology* 49(11):6772-6782
- Zourari A, Roger S, Chabanet C, Desmazeaud MJ (1991) Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. I. Souches de *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. *Lait* 71(4):445-461
- Zergoug A, Cheriguene A, Chougrani F (2016) In Vitro antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's raw milk of Mostaganem (West Algeria) against Gram negative bacteria responsible for urinary tract infections. *South Asian Journal of Experimental Biology* 6(1):15-22

RESUME

L'émergence sans cesse croissante de bactéries résistantes face à l'appauvrissement des ressources thérapeutiques et à l'absence d'avancée dans le domaine des antibiotiques, mettent en avant l'importance de trouver de nouvelles solutions.

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires un moyen de bio conservation efficace de nombreux produits alimentaires.

Les 200 bactéries lactiques isolées à partir du lait (chamelle et chèvre) et des produits laitiers fermentés traditionnels (Jben et kamaria) du sud Algérien: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont identifiées phénotypiquement.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne vis-à-vis de souches pathogènes multirésistantes, isolées à partir de patients atteints d'infections au service de réanimation est évaluée et les souches résistantes aux antibiotiques sont retenues.

Ensuite, les souches lactiques isolées, sélectionnées antagonistes *Lactococcus raffinolactis* LAB9 et *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*cremoris* LAB13 sont utilisées pour une éventuelle caractérisation de bactériocines.

La caractérisation physico-chimique de bactériocines produites chez les souches isolées, sélectionnées antagonistes (LAB9 et LAB13) a révélé leur thermo-résistance, accompagnée d'une activité inhibitrice stable à différentes valeurs de pH.

Ensuite, une purification partielle de bactériocine par précipitation avec le sulfate d'ammonium est réalisée et la concentration minimale inhibitrice est déterminée. L'activité antibiofilm souches LAB9 et LAB13 vis-à-vis de la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est effectuée.

L'étude du suivi de la cinétique de croissance a montré une inhibition considérable de la croissance *P. aeruginosa* (PA), après l'ajout d'un volume de 1 ml des surnageants des bactéries lactiques isolées, sélectionnées (LAB9 et LAB13). Cette inhibition est expliquée par l'arrêt du cycle cellulaire de *P. aeruginosa* PA (une croissance déséquilibrée), en comparaison avec la biomasse non traitée (croissance équilibrée).

En conclusion, les résultats obtenus ont montré la nécessité d'approfondir les recherches sur la purification des bactériocines par l'utilisation des techniques modernes telles que HPLC, FPLC, électrophorèse et leur clonage dans des vecteurs d'expressions puissants.

Mots clés: Produits laitiers, bactéries lactiques, bactéries pathogènes , multirésistance, Bactériocine, CMI , CMB, Biofilm.