

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
*Université A/ MIRA de Béjaia*  
*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Microbiologie*

## **Mémoire**

**En vue de l'obtention du diplôme de**

## **Magister**

**En Microbiologie Appliquée.**

**Thème :**

*Criblage de souches de bactéries lactiques douées  
d'activité antibactérienne envers Staphylococcus aureus  
multirésistant*

Présenté par : **M<sup>r</sup> MADI Nassim**

**Soutenu le : 14 / 07 / 2010**

**Devant le jury composé de :**

<b>M<sup>r</sup> BENALLAOUA S.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. de Béjaia</b>	<b>Président</b>
<b>Mme SADOUN D.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. de Béjaia</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M<sup>r</sup> IGUEROUADA A.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. de Béjaia</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme BEJOU F.</b>	<b>Maitre de conférences A</b>	<b>Univ. de Béjaia</b>	<b>Examineur</b>
<b>Melle BENDALI F.</b>	<b>Maitre de conférences B</b>	<b>Univ. de Béjaia</b>	<b>Invitée</b>
<b>Mme AMRANE Y.</b>	<b>Docteur</b>	<b>Univ. de Béjaia</b>	<b>Invitée</b>

**2009/2010**

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma directrice de mémoire **Mme Sadoun D.**, Professeur à l'université A. Mira de Béjaia, pour sa rigueur scientifique et ses qualités humaines. Ses conseils et ses encouragements ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Mr Benallaoua S.** Professeur à l'université A. Mira de Béjaia, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'être président du jury.*

*Mes remerciements s'adressent également à **Mr IGVEROUADA A.** professeur à L'université A. Mira de Béjaia, et **Mme BEJOU F.** Maître de conférences à l'université A. Mira de Béjaia, qui ont accepté de juger ce travail, pour l'intérêt qu'ils lui ont manifesté et leur disponibilité.*

*Je tiens aussi à remercier **Melle BENDALI F.** Maître de conférences à l'université A. Mira de Béjaia, Pour son aide, soutien et ces précieux conseils pendant la réalisation de ce travail.*

*J'adresse mes vifs remerciements au Docteur **Mme AMRANE Y.** médecin spécialiste en anatomie et cytologie pathologiques, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son aide précieuse.*

*Mes remerciements sont également Adressés à*

*Tout le personnel de l'hôpital d'Amizour pour leur contribution à la réalisation de ce travail.*

***Mr Bakli A.** Docteur vétérinaire pour sa coopération et sa disponibilité.*

*Tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée et particulièrement l'équipe de Microbiologie du Lait et des Probiotiques, ainsi que tous mes collègues et ami(e) s sont chaleureusement remerciés.*

## *DEDICACES*

*Je dédie ce modeste travail :*

- ❖ A la mémoire de mon père*
- ❖ A ma mère*
- ❖ A mes frères, Yazid, Fatah et sa femme*
- ❖ A mes sœurs, malika, hayette et son mari*
- ❖ A toute ma famille*
- ❖ A tous ceux qui me sont très chers.*

## Liste des abréviations

**A.** Absorbance

**ADN.** Acide desoxyribonucléique

**ARN.** Acide ribonucléique

**ATP.** Adenosine triphosphate

**BHI.** Brain Heart Infusion

**C.** Cytosine

**CA-MRSA.** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

**CD4.** Cluster of differentiation 4

**CFA-SFM.** Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CMT.** California Mastitis Test

**D.** Dalton

**DO.** Densité optique

**FAO.** Food and Agriculture Organisation

**FSNV.** Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

**G.** Guanine

**HA-MRSA.** Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

**HCl.** Hydrochloric acid

**L.** Souche de *Staphylococcus aureus* isolée de lait mammitieux

**LAB.** Lactic acid bacteria (bactérie lactique)

**Log.** Logarithme (decimal)

**MHC.** Major Histocompatibility Complex

**MRS.** Man Rogosa Sharp

**MRSA.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

**NADH.** Nicotinamide Adenine Dinucleotides Hydrogéné

**OMS.** Organisation Mondiale de la Santé

**PCA.** Plat Count Agar

**PCR.** Polymerase Chain Reaction

**pH.** Potentiel d'hydrogène

**PM.** Poids moléculaire

**PMF.** Proton motrice force

**PPM.** Partie Par Million

**PRSA.** Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

**S.** Souche de *Staphylococcus aureus* isolée des selles

*S. Staphylococcus*

**SARM.** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

**SE.** *Staphylococcus aureus* enterotoxin

**TIAS.** Toxi-infection Alimentaire Staphylococcique

**TCR.** T cell receptor

**U.S.** United States

**UFC.** Unité Formation Colonie

**UI.** Unité International

**VRSA.** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> A : <i>S. aureus</i> vue en microscopie optique après coloration de Gram (X 1000), B : <i>S. aureus</i> vue en microscopie électronique (X 3025).....	14
<b>Figure 2.</b> Mécanisme d'une intoxication due à une entérotoxine staphylococcique.....	20
<b>Figure 3.</b> Mécanisme d'action d'une entérotoxine (superantigène) staphylococcique.....	21
<b>Figure 4.</b> Emergence de souches de <i>S. aureus</i> résistantes aux antibiotiques et leurs vagues pandémiques dans le temps aux Etats-Unis.....	24
<b>Figure 5.</b> Isolement de <i>Staphylococcus aureus</i> à partir des selles.....	35
<b>Figure 6.</b> Isolement de <i>Staphylococcus aureus</i> à partir de lait mammitieux.....	36
<b>Figure 7.</b> Standardisation de l' <i>inoculum</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
<b>Figure 8.</b> Standardisation de l' <i>inoculum</i> des bactéries lactiques.....	41
<b>Figure 9.</b> Schéma du test des spots.....	43
<b>Figure 10.</b> Mesure de la concentration extracellulaire des ions $K^+$ .....	45
<b>Figure 11.</b> Cultures pures et mixtes des deux souches de <i>S. aureus</i> dans du lait écrémé.....	47
<b>Figure 12.</b> Standardisation de l' <i>inoculum</i> de <i>S. aureus</i> dans du lait écrémé.....	49
<b>Figure 13.</b> Standardisation de l' <i>inoculum</i> de LAB dans du lait écrémé.....	50
<b>Figure 14.</b> Protocole de dénombrement de <i>S. aureus</i> dans les selles des lapins.....	52
<b>Figure 15.</b> Taux d'antibiotiques administrés aux patients par classe.....	59
<b>Figure 16.</b> Fréquence d'isolement des bactéries à l'origine de mammites.....	62
<b>Figure 17.</b> Taux de résistance des souches de <i>S. aureus</i> (isolées des selles) aux différents antibiotiques testés.....	64
<b>Figure 18.</b> Antibiogrammes de <i>S. aureus</i> ( $S_3$ ) (1 : OX, 2 : FOX, 3 : P, 4 : CTX, 5 : VA, 6 : CIP, 7 : E, 8 : PT, 9 : GM).....	65
<b>Figure 19.</b> Taux de résistance des souches de <i>S. aureus</i> isolées de lait mammitieux aux différents antibiotiques testés.....	68
<b>Figure 20.</b> Antibiogrammes de <i>S. aureus</i> ( $L_5$ ) (1 : OX, 2 : FOX, 3 : P, 4 : CTX, 5 : VA, 6 : CIP, 7 : E, 8 : PT, 9 : GM).....	68
<b>Figure 21.</b> Test des spots, <b>a</b> : <i>Lb. paracasei</i> à l'égard de <i>S. aureus</i> ( $S_3$ ) avec une zone d'inhibition de 20 mm, <b>b</b> : <i>Lb. paracasei</i> à l'égard de <i>S. aureus</i> ( $L_5$ ) avec une zone d'inhibition de 18 mm.....	70

<b>Figure 22.</b> Mesure de la concentration des ions $K^+$ des surnageants des cultures ( <i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ), <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ), <i>Lb. paracasei</i> , <i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ) + <i>Lb. paracasei</i> , <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ) + <i>Lb. paracasei</i> ) en fonction du temps.....	72
<b>Figure 23.</b> Cinétique de croissance de <i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i> et en culture pure, dans le lait écrémé.....	74
<b>Figure 24.</b> Evolution du pH de la culture mixte de <i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ) avec <i>Lb. paracasei</i> et de la culture pure de <i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ), dans le lait écrémé.....	74
<b>Figure 25.</b> Cinétique de croissance de <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i> et en culture pure, dans le lait écrémé.....	75
<b>Figure 26.</b> Evolution du pH de la culture mixte de <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ) avec <i>Lb. paracasei</i> et de la culture pure de <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ), dans le lait écrémé.....	76
<b>Figure 27.</b> Evolution des comptes fécaux de <i>S. aureus</i> au cours de l'étude <i>in vivo</i> .....	79
<b>Figure 28.</b> Coupes histologiques des intestins grêles des lapins disséqués (x40).....	83
<b>Figure 29.</b> Coupe histologiques des colons des lapins disséqués (x40).....	84
<b>Figure 30.</b> Coupe histologique de l'intestin du lapin diarrhéique (muqueuse infiltrée par des globules blancs × 60).....	85

## Liste des figures en annexes

### Annexe 1. Données bibliographiques

**Figure 1.** Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique à «deux peptides» (Lacticine 3147 A1 et A2)

**Figure 2.** Destruction cellulaire par formation de pores par des lantibiotiques

### Annexe 2. Résultats

**Figure 1.** Courbe d'étalonnage du dosage des ions  $K^+$  en spectrophotométrie de flamme

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Exemples de produits probiotiques commerciaux et leurs applications.....	8
<b>Tableau II.</b> Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés).....	12
<b>Tableau III.</b> Principaux facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
<b>Tableau IV.</b> Caractéristiques des entérotoxines staphylococciques.....	19
<b>Tableau V.</b> Nombre et pourcentage de souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méthicilline isolées par laboratoire chez des patients hospitalisés en Algérie.....	23
<b>Tableau VI.</b> Nombre et pourcentage de souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes aux antibiotiques chez des patients hospitalisés et externes en Algérie.....	25
<b>Tableau VII.</b> Exemples de bactériocines de bactéries lactiques et leur spectre d'action sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
<b>Tableau VIII.</b> Antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour <i>Staphylococcus aureus</i> .	37
<b>Tableau IX.</b> Etape de la circulation (déshydratation, éclaircissement et imprégnation).....	54
<b>Tableau X.</b> Etapes de la coloration histologique.....	55
<b>Tableau XI.</b> Résultats de l'identification des souches de <i>S. aureus</i> .....	56
<b>Tableau XII.</b> Répartition des souches de <i>S. aureus</i> en fonction du service hospitalier, âge, sexe et antibiotiques administrés au patient.....	57
<b>Tableau XIII.</b> Antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i> isolées des selles.....	64
<b>Tableau XIV.</b> Antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i> isolées de lait mammiteux.....	67
<b>Tableau XV.</b> Résultats du test des spots.....	70

## Liste des tableaux en annexes

### Annexe 1. Données bibliographiques

**Tableau I.** Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques

**Tableau II.** Exemples d'essais randomisés montrant un effet significatif de bactéries lactiques versus placebo dans la prévention des diarrhées digestives liées à l'antibiothérapie

## **Annexe 2. Résultats**

**Tableau I.** Résultats du dénombrement des souches de *S. aureus* dans l'eau physiologique

**Tableau II.** Résultats du dénombrement des souches de bactéries lactiques dans l'eau physiologique

**Tableau III.** Résultats du dénombrement de *Lb. paracasei* et de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) dans le lait écrémé

**Tableau IV.** Comparaison par le test *t* de Student de l'évolution de la concentration des ions K<sup>+</sup> (mg/ml) des surnageants de culture mixte de *Lb. paracasei* et des souches (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) en bouillon BHI

**Tableau V.** Analyse statistique (test de Student) de la croissance de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) en culture mixte avec *Lb. paracasei* et en culture pure, dans le lait écrémé

**Tableau VI.** Analyse statistique (test de Student) de la croissance de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) en culture mixte avec *Lb. paracasei* et en culture pure, dans le lait écrémé

**Tableau VII.** Comparaison par le test *t* de Student de l'évolution de la croissance de la souche (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) en culture mixte avec *Lb. paracasei* dans le lait écrémé

**Tableau VIII.** Comparaison par le test *t* de Student de l'évolution des comptes fécaux de *S. aureus* S<sub>3</sub> (Log UFC/g) des lapins de Lot 1 et 2

**Tableau IX.** Evolution du pH de la culture mixte de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) avec *Lb. paracasei* et de la culture pure de *S. aureus* (L<sub>5</sub>), dans le lait écrémé

**Tableau X.** Evolution du pH de la culture mixte de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) avec *Lb. paracasei* et de la culture pure de *S. aureus* (S<sub>3</sub>), dans le lait écrémé

## **Annexe 3. Composition des milieux de cultures utilisés**

**Tableau I.** Gélose et bouillon Chapman

**Tableau II.** Gélose et bouillon nutritif

**Tableau III.** Gélose et bouillon BHI

**Tableau IV.** Gélose et bouillon MRS

**Tableau V.** Gélose Mueller Hinton

**Tableau VI.** Gélose PCA (Plate Count Agar)

**Tableau VII.** Bouillon Giolitti et Cantoni

## Glossaire

**Aldolase** : Complexe enzymatique qui catalyse la scission du fructose 1-6- diphosphate, utilisée pour les marquages métaboliques.

**Antibiothérapie** : Un traitement par antibiotique

**Antimutagène** : Produit s'opposant aux substances susceptibles d'introduire des mutations

**Atopique** : Relatif à l'atopie, prédisposition familiale à certaines affections, telles que des allergies.

**Atrophie**: Diminution, réduction, dépréciation, rétrécissement

**Ballonnements** : Gonflement du ventre par les gaz

**Bordure en brosse** : Est un des différents types d'organisation des microvillosités avec les microvillosités basales et les plateaux striés. Le plateau strié se caractérise par la densité des microvillosités.

**Bulleux** : Qualifie une affection cutanée avec apparition de bulles

**Canule** : Tuyau introduit par un orifice de l'organisme.

**Chorion** : Définit le tissu conjonctif sous-jacent dans une muqueuse.

**Colite** : Inflammation du côlon

**Commensal** : Espèces commensales, dont l'une vit associée à l'autre en profitant des débris de ses repas, mais sans lui nuire.

**Déshydratation** : Etat d'un organisme qui a subi une importante perte d'eau.

**Duodénum** : Début de l'intestin grêle à la sortie de l'estomac

**Dyspnée** : Difficultés de respiration, suffocation, essoufflement.

**Eczéma atopique** : Est une maladie dermatologique. Les plaques rouges apparaissent en général entre l'âge de 3 mois et 2 ans. Débutant et prédominant au visage, l'eczéma siège avant tout sur les joues, le front, le cou. Il peut s'étendre au cuir chevelu, plus rarement déborder sur le thorax et les plis de flexion.

**Emétique** : Qui provoque des vomissements.

**Endémique** : Qui a les caractères de l'endémie, d'une maladie particulière à une région où elle existe en permanence.

**Endocardite** : Inflammation de l'endocarde, de la membrane interne du cœur

**Entérocolite** : Inflammation de l'intestin grêle et du colon.

**Entérocytes** : Cellule de l'épithélium de la muqueuse intestinale, dont le pôle apical est revêtu d'un plateau strié présentant la réaction d'une phosphatase alcaline.

**Epidémie** : Atteinte simultanée d'un grand nombre d'individus d'un pays ou région par une maladie contagieuse

**Épithélium** : Tissu fondamental formant soit un revêtement externe (en surface de la peau) ou interne (en surface d'une muqueuse), soit une glande.

**Flatulences** : Accumulation de gaz dans l'appareil digestif

**Follicule** : Structure arrondie au sein d'un tissu ou d'un organe, qui délimite une cavité ou une substance.

**Folliculite** : Inflammation d'un follicule pileux.

**Furoncle** : Petit abcès limité produit par un staphylocoque.

**Gastro-entérite** : Inflammation aiguë des muqueuses de l'estomac et des intestins

**Holoxénique** : Animal librement exposé depuis sa naissance aux microorganismes de son milieu naturel et notamment à ceux que son espèce a acquis au cours de son évolution.

**Hyperhémie** : Augmentation de la quantité de sang dans les capillaires d'une partie du corps.

**Iléon** : Partie de l'intestin grêle

**Impétigo** : Affection contagieuse de la peau, due au streptocoque, caractérisée par le développement de pustules qui se transforment en croûtes jaunes.

**Jéjunum** : Partie de l'intestin grêle entre le duodénum et l'iléon

**Lamina propria** : Tissu conjonctif tapissant les muqueuse dont la muqueuse digestive

**Léthargie** : Sommeil pathologique profond avec relâchement musculaire total.

**Lipophilie** : Affinité pour les corps gras, tendance à la surcharge en graisses

**Lymphoblastiques** : Relatif aux lymphoblastes, cellules apparentées aux globules blancs du sang.

**Maladie de Crohn** : maladie inflammatoire chronique de l'ensemble du tube digestif.

**Nosocomial** : Qui se contracte à l'hôpital "infection nosocomiale".

**Ostéomyélite** : Affection inflammatoire staphylococcique des os.

**Otite** : Affection inflammatoire de l'oreille

**Pathogène**: Est un agent biologique responsable d'une maladie infectieuse.

**Périnéphrétique** : Situé autour du rein.

**Phlegmon**: Inflammation purulente d'un tissu organique

**Placebo** : Produit inactif substitué à un médicament pour tester la participation psychologique du patient.

**Pochite** : Est une inflammation de la poche constituée après une anastomose iléo-anale.

**Putréfaction** : Pourrissement, décomposition

**Pyrrolidone**: Tétrahydropyrrole C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>N.

**Rectocolite hémorragique (RCH) :** Est une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) qui affecte l'extrémité distale du tube digestif, c'est-à-dire le côlon et le rectum (qui est toujours touché).

**Septicémie :** Infection générale provoquée par le développement de germes pathogènes dans le sang

**Sevrage :** Arrêt de l'allaitement d'un enfant ou d'un petit animal pour lui donner une alimentation plus solide.

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

**Spasmes :** Contraction musculaire violente, passagère et involontaire

**Syndrome du choc toxique : (SCT)** Est une maladie infectieuse rare et aiguë mais potentiellement létale causée par une toxine bactérienne qui pénètre dans la circulation sanguine suite à une infection par un agent pathogène. Cette toxine, appelée TSST-1, est un des nombreux facteurs de virulence associé à *Staphylococcus aureus*, ou staphylocoque doré.

**Thrombus :** Caillot sanguin formé dans une veine ou une artère et provoquant la thrombose.

**Transit :** Passage des aliments dans l'appareil digestif

**Villosités intestinales :** Sont des structures (replis de la muqueuse et du tissu conjonctif sous-jacent) de l'intestin grêle permettant l'amplification des processus d'absorption par augmentation de la surface intestinale et donc du nombre de cellules.

**Virulence :** Désigne le caractère pathogène, nocif et violent d'un micro-organisme (bactérie ou champignon).

**Zoonose :** Maladie qui peut se transmettre de l'animal à l'homme ou de l'homme à l'animal

(Reverso, 2007)

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

### Partie Bibliographique

#### **I. Bactéries lactiques**

1. Définition.....	4
2. Principales caractéristiques.....	4
3. Taxonomie et classification.....	5
3.1. <i>Lactococcus</i> .....	5
3.2. <i>Enterococcus</i> .....	6
3.3. <i>Lactobacillus</i> .....	6
4. Habitat.....	7
5. Effets positifs sur la santé.....	7
5. 1. Traitement de certaines affections intestinales avec diarrhée.....	8
5. 2. Amélioration de la digestion du lactose.....	10
5. 3. Cancérogenèse.....	10
5. 4. Diminution du cholestérol sérique.....	11
5. 5. Diminution des allergies alimentaires.....	11

#### **II. *Staphylococcus aureus***

1. Taxonomie.....	13
2. Caractéristiques générales.....	13
3. Habitat.....	14
4. Pouvoir pathogène.....	15
4. 1. Facteurs de virulence .....	15
4. 2. Principales pathologies.....	15
4. 3. Toxi-infections alimentaires.....	17
4. 4. Entérotoxines.....	18
4. 4. 1. Caractéristiques.....	18
4. 4. 2. Mode d'action.....	20
5. Résistance aux antibiotiques.....	22
5. 1. Bêtalactamines.....	22
5. 2. Glycopeptides.....	23
5. 3. Aminosides.....	24

5. 4. Macrolides, lincomycines et streptogramines (MLS).....	24
5. 5. Quinolones.....	25
<b>III. Antagonisme des bactéries lactiques</b>	
1. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques.....	26
1. 2. Acides organiques.....	26
1. 2. 1. Acide lactique.....	26
1. 2. 2. Acide acétique.....	26
1. 3. Peroxyde d'hydrogène.....	27
1. 4. Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ).....	27
1. 5. Composés aromatiques.....	27
1. 5. 1. Diacétyle.....	27
1. 5. 2. Acétaldéhyde.....	28
1. 6. Acides gras.....	28
1. 7. Substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire.....	28
1. 8. Bactériocines.....	29

## Partie pratique

### Matériel et méthodes

<b>I. Isolement des souches de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	33
1. A partir des selles.....	33
2. A partir de lait de vaches mammites.....	33
<b>II. Purification et identification des souches de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	34
<b>III. Sélection des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> multirésistantes</b> .....	37
1. Préparation de l' <i>inoculum</i> standard de <i>S. aureus</i> .....	37
2. Antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i> .....	37
<b>IV. Mise en évidence de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> de souches de bactéries lactiques à l'égard des souches de <i>S. aureus</i> résistantes aux antibiotiques</b> .....	40
1. Souches de bactéries lactiques utilisées.....	40
2. Préparation de l' <i>inoculum</i> standard des bactéries lactiques.....	40
3. Test des spots.....	42
4. Mesure de la concentration extracellulaire des ions K <sup>+</sup> .....	44
5. Etude de l'antagonisme de la souche de LAB envers les souches de <i>S. aureus</i> dans du lait écrémé.....	46

<b>V. Etude <i>in vivo</i> de l'antagonisme de LAB envers la souche de <i>S. aureus</i> retenue.....</b>	<b>48</b>
1. Standardisation des <i>inocula</i> .....	48
2. Préparation des animaux d'expérimentation.....	51
3. Estimation du nombre des staphylocoques dans la flore fécale.....	51
4. Provocation de la diarrhée.....	51
5. Traitement.....	51
6. Dénombrement de <i>S. aureus</i> dans les selles.....	53
7. Dissection.....	53
8. Réalisation des coupes histologiques.....	54
<b>VI. Analyse statistique.....</b>	<b>55</b>

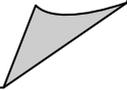
## **Résultats et discussion**

<b>Chapitre I. Isolement et identification des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>56</b>
1. A partir des selles.....	56
2. A partir de lait de vaches mammites.....	61
<b>Chapitre II. Antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i> identifiées.....</b>	<b>64</b>
<b>Chapitre III. Mise en évidence de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> des souches de bactéries lactiques à l'égard des souches de <i>S. aureus</i> résistantes aux antibiotiques.....</b>	<b>70</b>
1. Test des spots.....	70
2. Mesure de la concentration extracellulaire des ions K <sup>+</sup> .....	72
3. Etude de l'antagonisme de <i>Lb. paracasei</i> envers <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> et L <sub>5</sub> ) dans du lait écrémé.....	73
<b>Chapitre IV. Etude <i>in vivo</i> de l'antagonisme de <i>Lb. paracasei</i> envers <i>S. aureus</i> (S<sub>3</sub>).....</b>	<b>78</b>
1. Dénombrement de staphylocoques dans la flore fécale avant contamination.....	78
2. Contamination des lapins et traitement par <i>Lb. paracasei</i> .....	78
3. Etude des observations des coupes histologiques .....	82
<b>Conclusion.....</b>	<b>88</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

*Ce travail a été  
réalisé au laboratoire  
de Microbiologie appliquée  
Equipe lait et probiotiques  
de l'Université A.Mira de Béjaia*



# *Introduction*

## Introduction

*Staphylococcus aureus* est la première cause d'infections bactériennes à travers le Monde (Weems, 2001). *S. aureus* est impliqué dans 19 à 25% des bactériémies, 20 à 25% des pneumonies, 32 à 44% des infections cutanées et 15 à 30% des toxi-infections alimentaires collectives (Diekema *et al.*, 2001 ; Vincenot *et al.*, 2008). En Algérie, 18% des cas d'intoxications alimentaires recensés sont dus à la consommation de produits laitiers. L'espèce bactérienne la plus fréquemment incriminée dans les toxi-infections impliquant le lait cru et les produits laitiers demeure *Staphylococcus aureus* (De Buyser *et al.*, 2001), et l'une des principales causes de contamination du lait cru par *Staphylococcus aureus* reste la mammite sub-clinique (Normanno *et al.*, 2007).

Une mammite est une inflammation de la mamelle d'origine principalement bactérienne, qui se traduit très fréquemment par une élévation du nombre des cellules somatiques du lait (Deverriere, 2007). *S. aureus* est l'agent étiologique des mammites cliniques et sub-cliniques le plus prépondérant et le plus contagieux (Peles *et al.*, 2007). Plusieurs études menées dans la région de la Mitidja en Algérie, ont montré des taux de prévalence de mammites cliniques variant de 17 à 35% (Rahal *et al.*, 2009) et une enquête menée à Jijel a permis de déceler par le test de CMT (California Mastitis Test), la présence de mammites chez 80% de vaches dans 15 exploitations (Idoui *et al.*, 2009).

Le traitement et la prévention de cette infection requièrent l'utilisation massive d'antibiotiques, ce qui est en partie responsable de l'émergence de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques chez les troupeaux laitiers (Lollai *et al.*, 2008).

*Staphylococcus aureus* a développé des résistances à la plupart des antibiotiques mis sur le marché, en particulier la méthicilline (*S. aureus* résistant à la méthicilline ou SARM) (Hiramatsu *et al.*, 2002). De nombreux cas de mammites à SARM chez les troupeaux laitiers ont été rapportés (Kwon *et al.*, 2005 ; Moon *et al.*, 2007), la présence de telles souches chez le troupeau laitier est considérée comme étant une zoonose par la directive européenne et constitue donc une menace directe pour l'Homme (EU, 2003).

De même, les SARM sont devenus endémiques dans de nombreux hôpitaux (Eady et Cove, 2003). Entre 1970 et 1985, la proportion des SARM au sein de *S. aureus* était comprise entre 2 et 6%. En 2000, la prévalence des SARM est supérieure à 30% en Europe (Fluit *et al.*, 2001). Elle atteint 50% aux Etats-Unis et en Australie (Tiemersma *et al.*, 2004). En France, elle est de 30% en 2000 (Lepelletier et Richet, 2001). Un rapport sur le pourcentage de souches de *S. aureus*

résistantes à la méthicilline, isolées dans huit laboratoires, chez des patients hospitalisés en Algérie, a montré que 37,5% des souches isolées étaient des SARM (OMS, 2008).

**Kaszanyitzhy-Juhasz (2007)** a rapporté le premier cas de transmission directe de souches SARM entre les vaches et l'Homme, ce qui a matérialisé cette menace. Les contaminations de produits laitiers par *Staphylococcus aureus* ou ses entérotoxines peuvent être à l'origine d'épidémies chez les consommateurs (**Deverriere, 2007**). En 1997, à Caracas, on a rapporté une intoxication massive de 462 patients suite à la consommation de lait non pasteurisé. Les analyses ont montré, qu'il s'agissait de *S. aureus* produisant les entérotoxines A et C (**Pasqualatto et al., 1998**).

Ce constat est alarmant surtout, lorsque ces souches sont résistantes aux antibiotiques (**Kwon et al., 2005**). Les industries laitières sont particulièrement préoccupées par ce problème, notamment celles qui produisent du fromage au lait cru. Des stratégies pour diminuer l'incidence de *Staphylococcus aureus* dans le lait sont donc déjà appliquées. Les techniques actuelles préconisent la pasteurisation ou alors l'emploi de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne à l'égard des micro-organismes pathogènes et d'altération (**Hamama et al., 2002**).

En plus de l'intérêt des bactéries lactiques dans la fabrication et la conservation des produits alimentaires, certaines souches ont été décrites comme ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine (probiotiques). A l'heure actuelle, différentes études mettent en exergue l'effet bénéfique de certains probiotiques. La consommation de ces micro-organismes a été suggérée comme traitement pour divers désordres intestinaux telle que la diarrhée infectieuse dont celle associée à *S. aureus* (**Vesterlund et al., 2006**).

De nombreuses études ont fait l'objet de recherche sur l'effet inhibiteur des bactéries lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus*. Cependant peu d'études semblent s'être intéressées à l'interaction entre les bactéries lactiques et *S. aureus* résistant aux antibiotiques (**Hamama et al., 2002 ; Charlier et al., 2008**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude, qui a pour objectif le criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne envers *S. aureus* multirésistants.

Un isolement et une identification de souches de *S. aureus* à partir de selles de patients diarrhéiques soumis à une antibiothérapie, au niveau de l'hôpital d'Amizour, et à partir de lait de vaches mammites après traitement aux antibiotiques seront menés.

Des antibiogrammes des souches identifiées comme étant *S. aureus* seront effectués afin de sélectionner les souches résistantes aux antibiotiques.

Un criblage de souches de bactéries lactiques sera effectué sur la base de leur effet antibactérien à l'égard des souches de *S. aureus* sélectionnées.

La souche de bactérie lactique ayant témoigné de la meilleure antibiose sera retenue pour des tests *in vitro* envers *S. aureus*.

Enfin, une étude *in vivo* sur lapins holoxéniques infectés par *S. aureus* multi-résistant sera menée. Après dissection des lapins, des coupes histologiques des portions intestinales et coliques seront réalisées, dans le but de voir si il ya un effet probiotique voire thérapeutique de la bactérie lactique choisie, sur la muqueuse intestinale après provocation de la diarrhée.

*Partie*  
*bibliographique*

# *I. Bactéries lactiques*

## 1. Définition

Le groupe des bactéries lactiques, a été défini pour la première fois par Orla-Jensen (1919), il réunit plusieurs genres de bactéries à Gram positif possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes, mais avec parfois peu d'homologie de leurs acides nucléiques (**Sutra et al., 1998**). Les bactéries lactiques sont des cellules hétérotrophes et chimio-organotrophes (**de Roissart, 1986**).

## 2. Principales caractéristiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles, coccobacilles ou cocci, à Gram positif, asporulés, généralement immobiles, anaérobies mais aérotolérants, ne possédant ni nitrate réductase, ni cytochrome-oxydase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994**).

Selon le type de fermentation utilisé, les bactéries lactiques sont dites (**Sutra et al., 1998**):

- Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- Hétérofermentaire : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO<sub>2</sub> et autres acides organiques.

Ces bactéries ont une faible aptitude biosynthétique et pour un bon déroulement de leur métabolisme, elles ont besoin selon l'espèce, de minéraux tels que le manganèse, le magnésium, le molybdène, le sélénium et le fer (**Desmazeaud et de Roissart, 1994**).

Elles sont généralement mésophiles, certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 5,5-6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel (**Caplice et Fitzgerald, 1999**). (**Tableau I, Annexe 1**)

Certaines espèces forment sur milieu hypersaccharosé des capsules (dextran) volumineuses : c'est le cas de *Leuconostoc mesenteroides* (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Certaines souches possèdent une pseudo-catalase fonctionnant uniquement en présence d'hème exogène présent dans le milieu. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont considérées comme micro aérophiles (**Tailliez, 2001**).

### 3. Taxonomie et classification

Elles appartiennent à la lignée des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales* (Garrity et Holt, 2001). Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* (G+C < 50mol %). Traditionnellement le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > 50mol% et affecté au phylum des *Actinomyces*. Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein et al., 1998).

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

Cependant, l'application de techniques de biologie moléculaire pour la détermination de relations phylogénétiques entre les bactéries lactiques associées aux aliments a résulté en des changements significatifs dans leur classification taxonomique. Selon Axelsson (2004), les bactéries lactiques englobent environ 20 genres et les plus importants sont : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weisella*. Le genre *Lactobacillus* est le plus grand, comportant autour de 80 espèces identifiées (Axelsson, 2004).

Deux nouvelles espèces lactiques ont été isolées d'un milieu viande. Il s'agit de *Lactobacillus verismoldensis* (Krockel et al., 2003) et *Vagococcus carniphilus* (Shewmaker et al., 2004). Ces deux espèces ont été respectivement isolées du saucisson cru et de la viande hachée.

#### 3.1. *Lactococcus*

Les études de Schleifer et al. (1985) basées sur des critères moléculaires, ont montré qu'il était justifié de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*. La taxonomie moléculaire des lactocoques a abouti à la différenciation de cinq espèces : *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. plantarum* et *Lc. picium*. *Lc. lactis* englobe trois sous espèces et un biovar, *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *hornieae*, *Lc. Lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Mofredj et al., 2007 ; Castala et Montel, 2008).

Les bactéries de ce genre sont des cocci en chaînettes de longueur variable, homofermentaires, présentant des antigènes du groupe N, avec une température minimale de croissance de 10°C et optimale de 30°C, ne peuvent pas croître en présence de 6,5 % de NaCl et à pH 9,6. Les lactocoques se retrouvent principalement dans le lait et les crèmes fermentées ainsi que dans les fromages où ils sont en quantité dominante et dans lesquels ils jouent un rôle irremplaçable en contribuant à la structure et en assurant la conservation et la salubrité des produits (**de Roissart et Luquet, 1994**).

### **3.2. *Enterococcus***

Ce genre renferme 30 espèces (**Garrity et al., 2005**) mais uniquement deux d'entre elles sont importantes en tant que probiotiques : *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* (**Klein et al., 1998**). Les entérocoques se caractérisent par leur développement à 10 et à 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5% de NaCl, et pH 9,6 et de survivre à un traitement de 60°C pendant 30min (**Sutra et al., 1998**). Ils sont retrouvés dans de nombreux habitats tels que le tractus gastro-intestinal, cavité buccale et le haut appareil génital de l'Homme et d'autres mammifères et également chez les oiseaux, reptiles, insectes, plantes, dans le sol et l'eau (**Morandi et al., 2005**).

Toutefois, l'utilisation des entérocoques chez l'Homme reste très controversée, étant donné qu'ils sont parfois associés à la contamination fécale et à la résistance aux antibiotiques. C'est pour cela que la sélection correcte des souches et les tests d'innocuité prennent une importance vitale dans le cas des entérocoques et permettent de garantir l'innocuité des souches utilisées. Ces souches sont le plus souvent utilisées comme probiotiques pour les animaux, mais il existe des produits renfermant des cultures vivantes d'*E. faecalis* ou d'*E. faecium* et destinés à l'utilisation humaine, tels que « Symbioflor » ou « Bioflorin » qui sont commercialisés en Allemagne, en Autriche et en Suisse (**Izquierdo alegre, 2009**).

### **3.3. *Lactobacillus***

Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* se distinguent des autres bactéries à Gram positif par le fait qu'elles sont anaérobies ou microaérophiles, immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase. Très polymorphes, leur morphologie microscopique varie d'une espèce à l'autre, de coccobacilles aux bacilles fins et allongés. Leur métabolisme énergétique est fermentaire. Le principal produit final de la dégradation des sucres est l'acide lactique auquel peut s'ajouter l'acide acétique, l'éthanol et le CO<sub>2</sub> pour les espèces hétéro- fermentaires (**Freney et al., 2000**).

Les travaux de taxonomie moléculaire ont incité Kandler et Weiss (1986) à subdiviser les lactobacilles en trois groupes selon leur type fermentaire (**Sutra et al., 1998**) :

Groupe I : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers, mais un grand nombre a été isolé chez l'Homme et les animaux (tractus digestif, organes génitaux).

Groupe II : ce sont des espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles. Ils sont isolés des fourrages, des produits laitiers et des produits carnés.

Groupe III : il est constitué d'espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentose phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'Homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale.

#### **4. Habitat**

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

#### **5. Effets positifs sur la santé**

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

en des quantités adéquates, confèrent un bienfait pour la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2001). Le **tableau I** montre certains des produits commerciaux contenant des souches probiotiques vendus en France et les indications pour lesquelles ils sont conseillés.

### **5.1. Traitement de certaines affections intestinales avec diarrhée**

Certaines bactéries lactiques sont utilisées dans la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses et des troubles digestifs liés à la prise d'antibiotiques (Hickson *et al.*, 2007) (**Tableau II, Annexe 1**). Les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques constituent un problème fréquent qui touche environ 20% des patients hospitalisés (Bartlett, 1992). Plusieurs mécanismes d'action des bactéries lactiques dans le traitement des affections intestinales avec diarrhées ont été proposés :

#### ➤ ***Production de substances antimicrobiennes***

Certaines bactéries lactiques ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines. *Lb. rhamnosus* GG produit par exemple des composés tels que le peroxyde d'hydrogène et le pyroglutamate qui inhibent *in vitro* la croissance de plusieurs bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Meurman *et al.*, 1995). Kovacs-Zomborszky *et al.* (1994) ont notamment montré que chez des porcs canulés au niveau du duodénum et de l'iléon, après consommation d'un mélange de probiotiques dénommé «Lacto Sacc» (*Lb. acidophilus*, *E. faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*), la concentration en acide lactique passe de 4,77% à 7,22% et le pH diminue de 7,39 à 6,42 dans l'iléon. Parallèlement à cette diminution de pH, ces auteurs ont observé une diminution de la population d'*Escherichia coli* dans les contenus intestinaux et les fèces.

#### ➤ ***Immunomodulation***

Plusieurs expériences chez l'Homme et l'animal montrent que certaines bactéries lactiques ingérées peuvent moduler les fonctions du système immunitaire. De Simone *et al.* (1992) ont montré que l'ingestion d'un mélange de *B. bifidum* et *Lb. acidophilus* (Infloran®) entraîne une augmentation du pourcentage de lymphocytes B dans le sang. Des études plus spécifiques portant sur la production d'anticorps ont montré que l'ingestion de *Lb. rhamnosus* GG raccourcit la durée des diarrhées causées par les rotavirus et stimule en parallèle la production d'anticorps contre ces derniers (Sarker, 2005 ; Szymanski *et al.*, 2006).

**Tableau I** Exemples de produits probiotiques commerciaux et leurs applications (Izquierdo alegre, 2009)

Produits	Souches	Effets
Activia <sup>®</sup> (Danone)	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	Aide à réguler le transit
Actimel <sup>®</sup> (Danone)	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Renforce les défenses naturelles de l'organisme
Yakult	<i>Lb. casei</i> Shirota	Régule le transit et Renforce les défenses naturelles
BION <sup>®</sup> 3(Merck)	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> + vitamines + minéraux	Renforce les défenses naturelles de l'organisme. Aide à retrouver la forme
BION <sup>®</sup> Transit (Merck)	<i>Lb. plantarum</i> 299V	Evite l'inconfort intestinal et les ballonnements
BION <sup>®</sup> Voyage (Merck)	Probio-Tec <sup>®</sup> Quatro : <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> LBY-27	Réduit la diarrhée du voyageur
BION <sup>®</sup> Flore intime (Merck)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus reuteri</i> RC 14	Restaure et protège l'équilibre de la flore vaginale
VSL#3 <sup>®</sup>	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Sc. thermophilus</i>	Traite le syndrome de l'intestin irritable, la colite ulcéraire et de la pochite.
Lacteol <sup>®</sup> (Axcan Pharma)	<i>Lb. acidophilus</i>	Evite la diarrhée
Gefilus <sup>®</sup> (Valio)	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Renforce les défenses naturelles de l'organisme

➤ ***Inhibition de l'adhésion des agents pathogènes à l'épithélium intestinal***

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'adhésion des bactéries lactiques au tractus digestif. L'idée générale est qu'une forte adhésion de ces bactéries à l'épithélium intestinal interférerait avec celle des agents pathogènes par saturation des sites de fixation. L'adhésion des bactéries lactiques à l'épithélium digestif a été étudiée *in vitro* avec des lignées cellulaires d'origine colique ou intestinale (Caco-2 et HT-29), animale (**Schneitz *et al.*, 1993**) ou humaine (**Chauvière *et al.*, 1992**). Certaines études ont montré que l'adhérence de *S. aureus* au mucus intestinal humain a été réduite de 39-40% par *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, alors que l'adhérence de *Lactobacillus reuteri*, *Lc. lactis* et *P. freudenreichii* réduit l'adhérence de *S. aureus* de 27- 36%, après 2 h d'incubation (**Vesterlund *et al.*, 2006**).

## **5.2. Amélioration de la digestion du lactose**

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

## **5.3. Cancérogénèse**

Des expériences menées avec des modèles animaux et chez l'Homme ont montré que plusieurs bactéries lactiques pouvaient diminuer les taux d'enzymes responsables de l'activation de certains procarcinogènes telles que la  $\beta$ -glucuronidase, la  $\beta$ -glucosidase, l'azoréductase, ou encore la nitroréductase (**Isaacs et Herfarth, 2008**). Plusieurs travaux épidémiologiques ont également suggéré un effet positif de la consommation de *Lb. casei* sur le risque de cancer superficiel de la vessie chez la souris (**Tomita *et al.*, 1994**) et du yaourt sur le risque de cancer du sein (**Van't Veer *et al.*, 1989**).

#### **5.4. Diminution du cholestérol sérique**

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

#### **5.5. Diminution des allergies alimentaires**

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatifs et préventifs de cette pathologie par des bactéries lactiques ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 nourrissons nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique (**Isolauri et al., 2000**). Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *Lb. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bb12, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *Lb. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques (**Kalliomaki et al., 2001**).

Le **tableau II** récapitule les effets sur la santé les plus couramment attribués aux bactéries lactiques.

**Tableau II** Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés)  
(Izquierdo alegre, 2009)

Effets des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none"><li>- Action de la <math>\beta</math>-galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle</li></ul>
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"><li>- Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale</li><li>- Stimulation du système immunitaire</li></ul>
Réduction du risque des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"><li>- Résistance à la colonisation par des agents pathogènes</li><li>- Stimulation du système immunitaire</li></ul>
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	<ul style="list-style-type: none"><li>- Modulation de la flore intestinale</li><li>- Stimulation du système immunitaire</li></ul>
Réduction du cholestérol	<ul style="list-style-type: none"><li>- Assimilation du cholestérol</li><li>- Déconjugaison des sels biliaires</li></ul>
Prévention du cancer du côlon	<ul style="list-style-type: none"><li>- Stimulation du système immunitaire</li><li>- Production de composés antimutagéniques</li><li>- Modulation des enzymes fécales carcinogéniques</li><li>- Dégradation de carcinogènes</li><li>- Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes</li></ul>

## II. *Staphylococcus aureus*

## 1. Taxonomie

Les staphylocoques ont été découverts par Pasteur et Koch en 1877 à partir du pus de furoncle et d'ostéomyélite. En 1881, Ogston faisait la première étude détaillée des staphylocoques et regroupait ces bactéries dans le genre *Staphylococcus*. En 1884, Rosenbach était capable d'isoler ces bactéries et de produire une culture pure. Il décrivait *Staphylococcus aureus* à cause de l'apparence jaune-orangée des colonies et montrait que *S. aureus* était responsable de furoncles et d'infections des plaies. La même année, Gram mettait au point une méthode de coloration des bactéries à partir du violet de gentiane : les staphylocoques étaient classés parmi les cocci à Gram positif (Corne, 2004).

Sur la base d'analyses des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la Classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Staphylococcaceae* (Garrity et al., 2005).

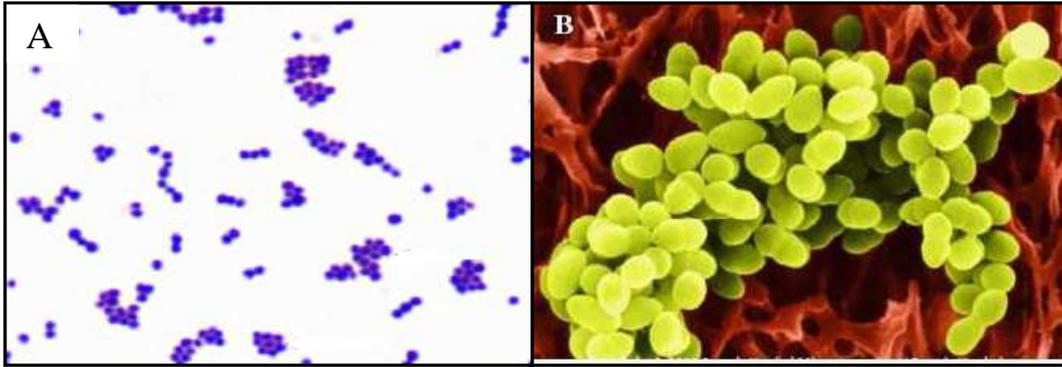
Le genre *Staphylococcus* dispose de plus d'une trentaine d'espèces divisées en deux groupes selon leur aptitude à produire une coagulase. Actuellement six espèces de ce genre sont à coagulase positive *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. aureus* ssp. *aureus* et *S. aureus* ssp. *anerobius* (Lamprell, 2003 ; Al alam, 2008).

## 2. Caractéristiques générales

Les bactéries de l'espèce *S. aureus* sont des coques à Gram positif de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, qui sont associées par paire, en chaînettes de 3 à 5 coques, ou en amas irréguliers en grappe de raisins (Figure 1), leur paroi cellulaire est formée de trois constituants majeurs: le peptidoglycane composé d'unités répétitives de N-acétylglucosamine β-1-4 liées à l'acide N-acétylmuramique, des acides téchoïques au ribitol phosphates liés via des N-acétylmanosaminyl β-1-4-N-acetylglucosamine au muramyl-6-phosphate, et la protéine A, liée au peptidoglycane par liaison covalente (Sutra et al., 1998).

La majorité des souches isolées d'infections humaines et animales produisent des polyosides capsulaires qui forment des microcapsules non visibles en microscopie optique (Schleifer, 1983).

Sur les milieux gélosés couramment utilisés (gélose nutritive, TSA, gélose columbia), *S. aureus* produit des colonies circulaires, à bords réguliers, bombées et luisantes. Leur diamètre varie de 1 à 3 mm après 24 h à 37°C et de 3 à 10 mm après 5 jours. Plusieurs souches de *S. aureus* produisent des colonies pigmentées en jaune doré plus ou moins intense (Sutra et al., 1998).



**Figure 1** A : *S. aureus* vue en microscopie optique après coloration de Gram (X 1000), B : *S. aureus* vue en microscopie électronique (X 3025) (*in Al alam, 2008*).

*S. aureus* est chimioorganotrophe, de type respiratoire anaérobie facultatif, à oxydase négative et catalase positive. Sa croissance est plus rapide et plus abondante en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies. C'est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C en fonction des souches (température minimale : entre 5 et 10 °C ; température maximale : environ 45 °C). Il est capable de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un pH optimal de croissance de 7 à 7,5. Il est halotolérant et peut se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10 %) (*Sutra et al., 1998*).

La majorité des souches de *S. aureus* sont hémolytiques et produisent une ADNase ainsi qu'une coagulase qui coagule le plasma de lapin (*Lamprell, 2003*).

Le génome de *S. aureus* est constitué par un chromosome circulaire d'environ 2800 paires de bases. Les gènes responsables de la virulence et de la résistance aux antibiotiques se trouvent aussi bien dans l'ADN chromosomique qu'extra-chromosomique. Ces gènes s'échangent entre souches, entre espèces ainsi qu'entre bactéries Gram positif par les éléments extra-chromosomiques (*Lecornet, 2007*).

### 3. Habitat

Les souches de *S. aureus* sont très répandues dans la nature (air, eau, sol), ce sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et de l'animal. Cependant, le principal réservoir de cette bactérie reste l'Homme ; 15 à 40 % des adultes ont un portage nasal persistant de *S. aureus* à une densité de  $10^3$  à  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>, le reste de la population a un portage intermittent. A partir des sites de portage, *S. aureus* colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides (aisselles, périnée) et les mains (*Heczko et al., 1981 ; Peacock et al., 2001*).

## **4. Pouvoir pathogène**

### **4. 1. Facteurs de virulence**

La virulence des souches de *S. aureus* impliquées dans des infections humaines ou animales est liée à la production d'une grande variété de composés. Ces composés sont soit associés à la paroi de la bactérie (protéine A, récepteurs pour des glycoprotéines de l'hôte, polysides capsulaires), soit excrétés dans l'environnement de la bactérie (toxines, coagulase, enzymes) (Sutra *et al.*, 1998 ).

Les facteurs de virulence majeurs de *S. aureus* sont présentés dans le **tableau III**

### **4. 2. Principales pathologies**

- **Chez les animaux (mammifères)**

Les principales pathologies dues à *S. aureus* en élevages sont les infections mammaires ou mammites chez les femelles en lactation (vache, brebis, chèvre). Chez la vache, les infections mammaires dues à *S. aureus* sont le plus souvent sub-cliniques et peuvent passer inaperçues, alors que chez la chèvre et la brebis, elles évoluent très souvent vers une forme gangreneuse. *S. aureus* est responsable de 20 à 40% des infections mammaires sub-cliniques chez la vache. La présence de *S. aureus* dans le lait, produit destiné à la consommation, représente un risque pour la santé humaine (Sutra *et al.*, 1998 ; Deverriere, 2007).

- **Chez l'Homme**

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

**Tableau III** Principaux facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Sutra et al., 1998 )

<b>Composés</b>	<b>Propriétés ou caractéristiques</b>	<b>Rôle présumé ou démontré dans la virulence</b>
<b>Composés associés à la paroi</b> -Protéine A -Polyosides capsulaires -Adhésines	-Fixation des IgG par leur partie Fc -Deux sérotypes prédominants (5 et 8). Forment des microcapsules pouvant masquer la paroi -Fixation de la fibronectine ou du collagène	-Résistance à la phagocytose -Résistance à la phagocytose -Adhésion aux cellules de l'hôte. Colonisation
<b>Toxiques protéiques</b> -Toxines $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ et $\delta$ -Entérotoxines (A, B, C, D, E et H) -Exfoliatine -Toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1)	-Actions sur la membrane cellulaire Effet cyto-toxique et/ou cytolytique. -Activité hémolytique <i>in vitro</i> -Action sur les fibres nerveuses digestives. -Rupture des liaisons intercellulaires (desmosomes) -Superantigènes (activation des lymphocytes T)	-Lésions cellulaires et tissulaires. Lyse des hématies -Action émétique. Etat de choc modéré -Découlement des couches superficielles de l'épiderme (maladie de Ritter du nouveau-né) -Etat de choc (dérèglements physiologiques multiples)
<b>Coagulase et enzymes</b> -Coagulase -Hyaluronidase -Lipase, phosphatase, nucléases, protéases	-Coagulation du plasma sanguin -Hydrolyse de l'acide hyaluronique -Hydrolyse de différentes macromolécules biologiques (lipides, acides nucléiques, protéines)	-Formation de thrombus -Diffusion tissulaire de <i>S. aureus</i> -Dégradations cellulaires ou tissulaires. Fourniture de nutriments à <i>S. aureus</i>

### 4. 3. Toxi-infections alimentaires

Une toxi-infection alimentaire staphylococcique (TIAS), est plutôt une intoxication due à l'ingestion d'une ou de plusieurs entérotoxines produites dans un aliment contaminé par un staphylocoque (**Kérouanton *et al.*, 2007**). La dose infectieuse d'entérotoxine staphylococcique est d'environ 1ng/g d'aliment, ce taux est atteint lorsque la population de *S. aureus* excède les  $10^5$  cellules/g. Cependant, les entérotoxines seraient détectables même à un niveau de *S. aureus* faible ( $10^3$  cellules/g) (**Lamprell, 2003**). La concentration d'entérotoxine A requise pour provoquer une TIAS chez l'être humain est de 200ng /kg. SEB est également très toxique, une dose de 0,4µg/kg est susceptible de provoquer un choc toxique chez l'Homme (**Bhunja, 2008**).

Les syndromes typiques associés aux TIAS apparaissent généralement 2 à 6 heures après ingestion et se traduisent par des vomissements avec ou sans diarrhées, crampes abdominales, généralement pas de fièvre quelque fois une légère hyperthermie ou bien au contraire une hypothermie. Des complications peuvent survenir en fonction de la dose de l'entérotoxine ou bien de la sensibilité de l'individu et de son état de santé : déshydratation, irritations musculaires, hypotension et état de choc. Cependant la mortalité est très rare et n'atteint que les individus sensibles aux méfaits de la déshydratation (**Zang et Stewart, 2001 ; Jay et Loessner, 2005** ). D'après **De Buyser *et al.* (2001)**, un rapport annuel sur les intoxications alimentaires fait sur 7 pays indique que le lait et les produits laitiers, sont impliqués dans 1 à 5% des cas d'intoxications alimentaires. Au Brésil, en 1999 ont eu lieu deux épidémies d'intoxication alimentaire touchant au total 378 personnes qui avaient consommé dans un cas du fromage au lait cru, dans l'autre du lait cru. L'analyse du fromage et du lait cru de la première épidémie a montré qu'ils contenaient *S. aureus* dans des quantités allant de  $2,4.10^3$  à  $2.10^8$  UFC/g et qu'il y avait eu production d'entérotoxines A, B et C. L'analyse du lait non pasteurisé indiquait la présence de staphylocoques à coagulase négative cette fois-ci, dans des quantités supérieures à  $2.10^8$  UFC/g, et la production d'entérotoxines C et D. Les entérotoxines spécifiques détectées supposaient que la source de contamination venait dans le premier cas des manipulateurs du fromage, et dans le second cas, de mammites cliniques (**Simeao do carmo, 2002**).

Une étude réalisée à Alger, qui a porté sur 69 vaches laitières appartenant à 22 élevages distincts, a permis d'aboutir aux résultats suivants : les analyses bactériologiques des échantillons de lait ont montré la présence de coques à Gram positif, notamment des staphylocoques à coagulase positive (7%), des staphylocoques à coagulase négative (1%) et des streptocoques (7%) (**Boulbina *et al.*, 2009**).

#### **4. 4. Entérotoxines**

Les entérotoxines staphylococciques (SE) sont de petites protéines de faible poids moléculaire (28 kDa en moyenne) constituées d'une simple chaîne d'acides aminés repliée sur elle-même sous forme globulaire (**Zang et Stewart, 2001; Le Loir et al., 2003**).

*S. aureus* produit une grande variété d'entérotoxines (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R et U), mais 95% des intoxications alimentaires sont provoqués par les entérotoxines classiques : A, B, C, D et E. L'entérotoxine A est la plus fréquemment produite (**Pelisser et al., 2009**). Le **tableau IV** résume quelques caractéristiques des entérotoxines staphylococciques.

##### **4. 4. 1. Caractéristiques**

Elles sont résistantes aux enzymes protéolytiques telles que la trypsine, la chymotrypsine et la papaine. La pepsine dégrade les entérotoxines à pH < 2 mais elle est inefficace à pH > 2. Par ailleurs, les entérotoxines peuvent résister à l'action des sucs digestifs, gastrique et intestinal (**Soriano et al., 2002**).

Elles sont relativement thermostables. Le barème thermique (temps et température de chauffage) pour une inactivation totale d'une entérotoxine varie en fonction des entérotoxines et dépend des conditions expérimentales (pH et composition du milieu, concentration d'entérotoxine dans le milieu, méthode de mesure de la quantité de toxine ou de l'activité toxique résiduelle après chauffage): de 5 à 30 minutes à 121°C à plusieurs heures entre 80 et 100 °C. La stabilité vis-à-vis du pH serait maximale à pH neutre et serait moins affectée par des valeurs de pH élevées (pH 10-11) que par des valeurs basses (pH 4-5) (**Sutra et al., 1998**).

Les entérotoxines sont exprimées de façon différente et leur production dépend de la phase de croissance de la bactérie, SEA et SEJ sont généralement synthétisées pendant la phase exponentielle alors que SEB, SEC et SED sont produites pendant la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance (**Bhunja, 2008**). Les différentes entérotoxines staphylococciques, présentent des similitudes de conformation dans leur séquence d'acides aminés (dont certaines très conservées), la chaîne polypeptidique des entérotoxines est constituée d'un taux élevé de lysine, acide aspartique, acide glutamique et de tyrosine. Elles possèdent toutes des activités biologiques similaires (**Zang et Stewart, 2001**) cependant elles sont sérologiquement distinctes (**Tran et al., 2006**).

**Tableau IV** Caractéristiques des entérotoxines staphylococciques (Jay et Loessner<sup>•</sup>, 2005 ; Bhatia et Zahoor \*, 2007).

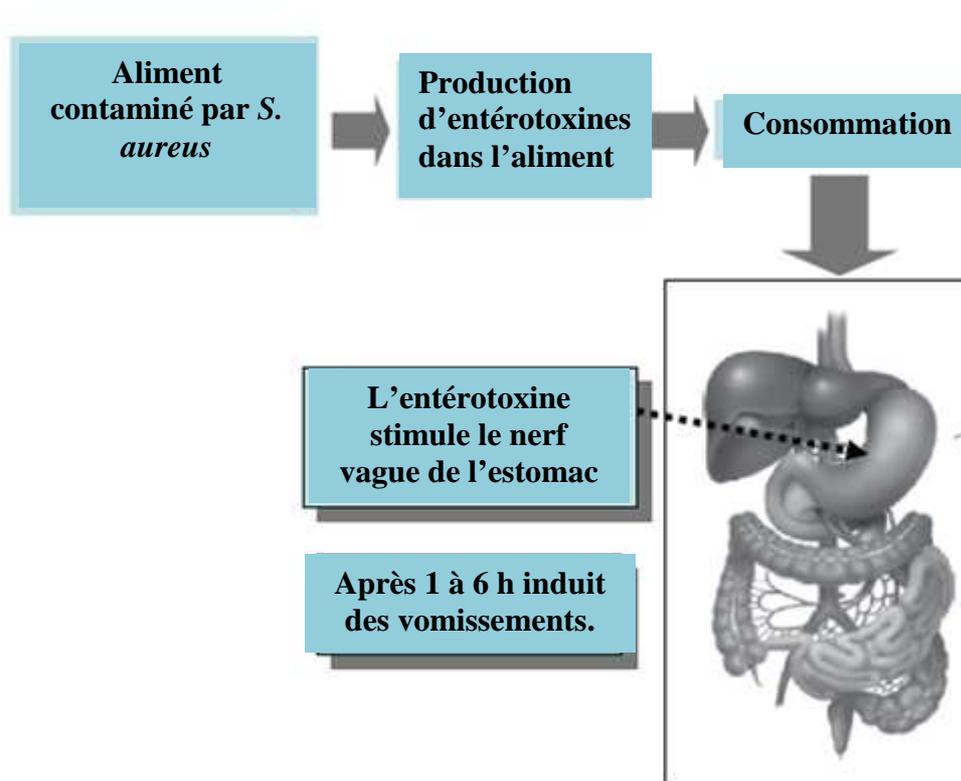
Entérotoxine staphylococcique (SE)	Dose émétique <sup>•</sup>	PM* (kDa)	Point isoélectrique*	Localisation génétique*
A	5	27,1	7,3	Prophage
B	5	28,336	8,6	Chromosome, transposon, plasmide
C1	5	27,531	8,6	Plasmide
C2	5-10	27,531	7,8	Nd
C3	<10	27,563	8,1	Nd
C (bovine)	Nd	27,618	7,6	îlot de pathogénicité
C (ovine)	Nd	27,517	7,6	Nd
C (caprine)	Nd	27,6	7	Nd
D	20	26,360	7,4	Plasmide (pIB485)
E	10-20	26,425	7	Bactériophage défectueux
G	Nd	27,043	5,7	« Enterotoxine gene cluster » (egc), chromosome
H	<30	25,210	Nd	Nd
I	Faible	24,928	Nd	egc, chromosome
J	Nd	28,565	8,65	Plasmide (pIB485)
K	Nd	25,539	6,5	îlot de pathogénicité
L	Nd	24,593	8,66	îlot de pathogénicité
M	Nd	24,842	6,24	egc, chromosome
N	Nd	26,067	6,97	egc, chromosome
O	Nd	26,777	6,55	egc, chromosome

Nd : Non déterminé (e)

#### 4. 4. 2. Mode d'action

Les entérotoxines staphylococciques diffèrent des autres entérotoxines du fait qu'elles possèdent des propriétés superantigéniques et qu'elles n'agissent pas directement sur les cellules de la muqueuse intestinale, elles ont une double action:

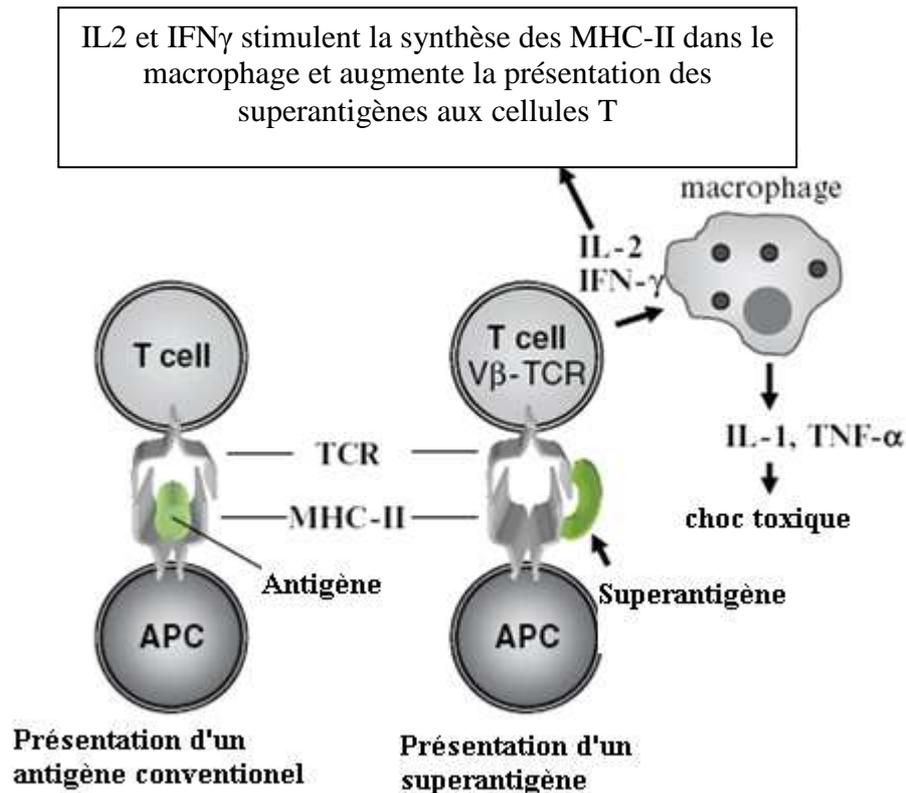
- Elles stimuleraient des récepteurs spécifiques d'entérotoxines localisés au niveau du tractus gastro-intestinal, ce stimulus activerait le centre nerveux émétique via des fibres sensibles du nerf vague, ce qui entraînerait des vomissements violents (Sutra *et al.*, 1998) (Figure 2).



**Figure 2** Mécanisme d'une intoxication due à une entérotoxine staphylococcique (Bhunja, 2008).

- Toutes les entérotoxines staphylococciques, liées à des syndromes de chocs toxiques sont des superantigènes bactériens, ce sont des molécules capables de stimuler une population de lymphocytes T beaucoup plus importante que celle stimulée par les antigènes conventionnels. Ces derniers nécessitent des cellules T CD4 qui facilitent leur contact avec le récepteur d'antigènes des lymphocytes T (TCR) et la molécule de classe II du complexe d'histocompatibilité majeur MHC. Les superantigènes quant à eux sont des molécules bifonctionnelles qui se fixent aux molécules de classe II du MHC et sur les récepteurs TCR via leur chaîne  $\beta$  ( $V\beta$ ) sans intermédiaire (Figure 3), et cette interaction TCR-entérotoxine-

molécules de classe II du MHC stimule les macrophages, ce qui conduit à la production des cytokines (IL1, IL2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), une surabondance de IL2 et de IFN- $\gamma$  induit une surexpression des molécules de classe II (MHC) dans le macrophage, qui à son tour fixe plus de molécules de superantigènes (active plus de cellules T). La synthèse des cytokines semble être la cause de la plupart des symptômes des gastroentérites staphylococciques (Jay et loessner, 2005 ; Bhunia, 2008).



**Figure 3** Mécanisme d'action d'une entérotoxine (superantigène) staphylococcique (Bhunia, 2008).

Les entérotoxines staphylococciques sont responsables de modifications histologiques. Des lésions de type inflammatoire sont observées dans différentes parties du tractus gastro-intestinal, les lésions les plus sévères apparaissant dans l'estomac et les parties hautes de l'intestin grêle. Dans ces zones, la muqueuse est hyperhémisée et présente des neutrophiles infiltrés dans l'épithélium et la lamina propria sous-jacente. Un exsudat mucopurulent est présent dans la lumière du duodénum. Dans le jéjunum, les cryptes sont agrandies et la bordure en brosse est interrompue voir absente en certains endroits. Des infiltrats étendus de neutrophiles et de macrophages apparaissent également dans la lamina propria du jéjunum (Deverriere, 2007).

## 5. Résistance aux antibiotiques

Le traitement des infections à *S. aureus* repose essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques. Cependant, depuis 1960, on assiste à l'émergence croissante de souches résistantes aux antibiotiques, avec une incidence de souches résistantes à la méthicilline (SARM) actuellement supérieure à 30 % en France (Al alam, 2008). Ces souches de SARM sont devenues progressivement résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques telles que les macrolides, les aminosides et les fluoroquinolones, en Algérie 13,9% des souches de SARM isolées chez des patients hospitalisés sont multirésistantes (OMS, 2008). Compte-tenu de la fréquence des infections à *S. aureus*, l'émergence de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques constitue un problème préoccupant en santé publique (Al alam, 2008).

### 5. 1. Bêtalactamines

Au commencement, la pénicilline était fortement efficace contre les infections staphylococciques, mais l'utilisation répandue de cette dernière a contribué à l'émergence en 1940 de souches résistantes à la pénicilline G et aux pénicillines A par production d'une pénicillinase d'origine plasmidique. *S. aureus* résistant à la pénicilline était pandémique dans les années 50 et au début des années 60 (DeLeo et Chambers, 2009) (Figure 4).

La résistance des staphylocoques aux pénicillines M est secondaire à une modification de la cible, à savoir la synthèse d'une protéine de liaison à la pénicilline PLP2a (ou PLP2' ), codée par le gène *mecA*, et qui présente une affinité diminuée pour toutes les bêtalactamines (Batard *et al.*, 2005).

En France, la résistance à la méthicilline concerne 11 à 15 % des souches communautaires de *Staphylococcus aureus* (Van der Meer-Marquet *et al.*, 2004). L'augmentation de la fréquence de ces souches, et leur association à des facteurs de virulences, incite à une surveillance serrée de ce phénomène (Vandenesch *et al.*, 2003).

Le tableau V résume le nombre et le pourcentage de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline isolées dans certains laboratoires chez des patients hospitalisés en Algérie.

**Tableau V** Nombre et pourcentage de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline isolées par laboratoire chez des patients hospitalisés en Algérie (OMS, 2008).

Laboratoires	MRSA	
	nombre	%
Institut Pasteur d'Algérie - Dely Ibrahim - Service de bactériologie médicale	29/81	35,8
Secteur Sanitaire de Birtraria - Alger - Laboratoire central	28/48	58,3
CHU Frantz Fanon - Blida - Laboratoire central	39/97	40,2
CHU Beni Messous - Alger - Laboratoire central	10/72	13,8
Hôpital militaire régional universitaire de Constantine - Laboratoire de microbiologie	25/56	44,6
E.H.S Dr M.A. Maouche - Alger - Service de Biologie Clinique.	3/9	FE
Centre Pierre et Marie Curie - Alger- Laboratoire central	8/42	19
EHS El Hadi Flici - Bab El Oued - Alger - Laboratoire central	40/80	50
<b>Totaux globaux</b>	<b>182/485</b>	<b>37,5</b>

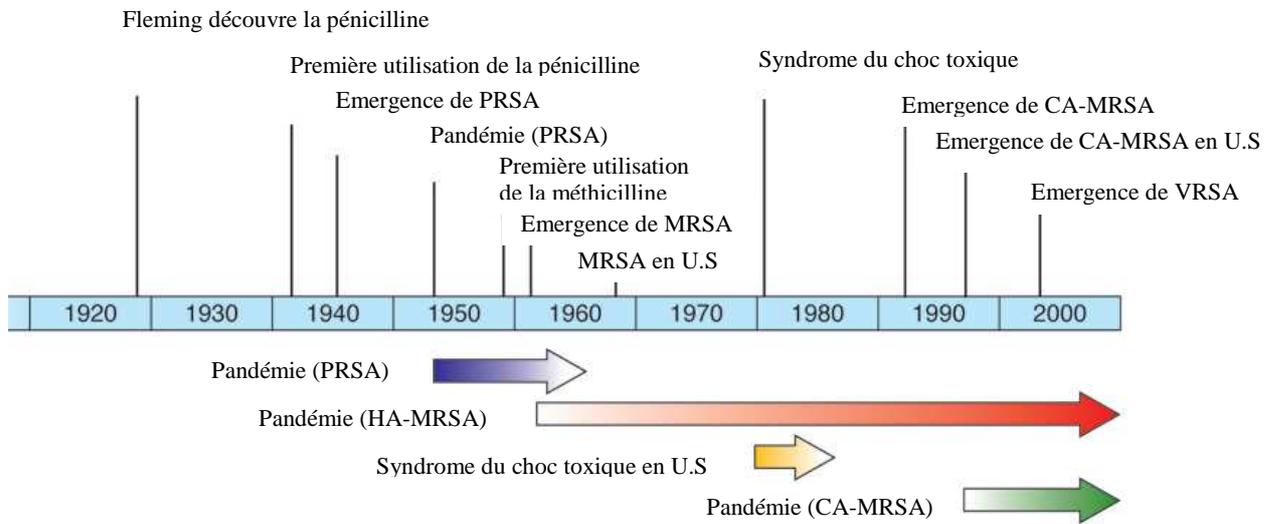
FE : Faible effectif (<30), CHU : Centre Hospitalo-universitaire, EHS : Etablissement Hospitalier Spécialisé

## 5. 2. Glycopeptides

Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) représentent le traitement de première intention en cas de résistance à la méthicilline ou d'allergie aux pénicillines. La résistance à la teicoplanine a été décrite dès les années 80 chez divers staphylocoques à coagulase négative puis chez *S. aureus*, la première souche de *Staphylococcus aureus* intermédiaire à la vancomycine n'a été décrite qu'en 1997, et la première souche résistante à la vancomycine en 2002 (**Figure 4**) (**Batard et al., 2005**).

Cette résistance intermédiaire n'est pas associée à des plasmides ou à des transposons, elle est attribuée à une surproduction du peptidoglycane, responsable d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi bactérienne, et donc du nombre de sites de fixation des glycopeptides que sont les dimères D-Ala-D-Ala (**Hiramatsu, 2001**). En revanche, la résistance vraie de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine, décrite sur quelques souches aux États-Unis, et caractérisée par des CMI  $\geq 32$  mg/l, est médiée par le gène *vanA*, probablement transféré horizontalement d'*Enterococcus* spp (**Batard et al., 2005**). La vancomycine en Algérie reste pour l'instant, le seul antibiotique constamment efficace ; cependant, l'hôpital de Bologhine (Alger) rapporte dans son bilan, une souche de *S. aureus* ayant présenté une résistance à la vancomycine : ces données

ne peuvent être prises en considération en l'absence de confirmation par une détermination de la CMI (OMS, 2008).



**Figure 4** Emergence de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques et leurs vagues pandémiques dans le temps aux Etats-Unis (DeLeo et Chambers, 2009).

### 5. 3. Aminositides

L'activité bactéricide *in vitro* des aminosides sur *Staphylococcus* spp est rapide, plus rapide en particulier que celle des glycopeptides. La survenue de mutations diminuant la pénétration intracellulaire des aminosides contre-indique leur administration en monothérapie. En pratique, le principal mécanisme de résistance de *Staphylococcus* spp aux aminosides est enzymatique. Les enzymes APH(3'), ANT(4') et APH(2')-AAC(6') inactivent respectivement la kanamycine (phénotype K), la kanamycine et la tobramycine (phénotype KT), et kanamycine, tobramycine et gentamicine (phénotype KTG) (Asseray *et al.*, 2002). La fréquence de la résistance à la gentamicine parmi les SARM a augmenté au cours des années 70 et 80, pour atteindre environ 90 % des souches vers 1990 (Aubry-Damon *et al.*, 1997). Depuis le début des années 90, la tendance s'est inversée, avec des fréquences de résistance à la gentamicine de 50-60 % dans les années 95-98, de 11 à 20 % en 1999 et 2000 (Bertrand *et al.*, 2004).

### 5. 4. Macrolides, lincomycines et streptogramines (MLS)

Les macrolides et les lincomycines ont une activité bactériostatique, alors que les streptogramines ont, en l'absence de résistance aux streptogramines B, une activité bactéricide. Plusieurs gènes de résistance aux MLS ont été décrits chez *Staphylococcus aureus*. En France, les plus fréquents sont *erm*(A) et *erm*(C). Les gènes *erm* confèrent une résistance croisée aux macrolides, lincomycines et streptogramines B. Leur expression peut être soit inductible soit

constitutive. Seuls les macrolides à 14 et 15 atomes de carbone peuvent induire l'expression de *erm* chez *Staphylococcus aureus* (Leclercq, 2002). En France, environ 50 à 60 % des souches hospitalières de *Staphylococcus* spp. sont sensibles à l'érythromycine, et environ 30 % sont résistantes aux lincomycines. La sensibilité aux streptogramines concerne 96 % des souches de *Staphylococcus* spp (Leclercq *et al.*, 2003).

### 5. 5. Quinolones

Les fluoroquinolones présentent l'avantage d'une bonne activité bactéricide, d'une bonne diffusion tissulaire et d'une excellente biodisponibilité permettant leur utilisation. Malheureusement, leur forte capacité à sélectionner des mutants résistants a fait apparaître en quelques années des taux de résistance très élevés chez les staphylocoques. En France, la sensibilité de *Staphylococcus* spp aux fluoroquinolones concerne actuellement environ 60 à 70 % des souches, et principalement les souches résistantes à la méthicilline (Leclercq *et al.*, 2003).

La moxifloxacinine et la gatifloxacinine, de nouvelles molécules de fluoroquinolones, sont caractérisées par leur faible capacité à sélectionner des mutants résistants *in vitro*, mais les applications thérapeutiques de ce constat restent à déterminer (Batard *et al.*, 2005).

Le **tableau VI** résume le nombre et le pourcentage de *Staphylococcus aureus* résistants aux antibiotiques (rapporté par 19 laboratoires de microbiologie chez des patients hospitalisés et externes en Algérie).

**Tableau VI** Nombre et pourcentage de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes aux antibiotiques chez des patients hospitalisés et externes en Algérie (OMS, 2008).

Antibiotiques	Hospitalisés		Externes		Total	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Penicilline	1552/1629	95,2	786/845	93	2338/2474	94,5
Oxacilline	11/71	15,5	8/33	24,2	19/104	18,2
Cefoxitine	197/702	28	92/397	23	289/1099	26,2
Kanamycine	123/254	48,4	50/139	35,9	173/393	44
Gentamicine	126/906	13,9	25/463	5,3	151/1369	11
Amikacine	162/1092	14,8	56/511	10,9	218/1603	13,6
Erythromycine	352/1448	24,3	127/642	19,8	479/2090	22,9
Clindamycine	28/171	16,3	8/80	10	36/251	14,3
Pristinamycine	17/797	2,1	6/446	1,3	23/1243	1,8
Vancomycine	1/1787	0,05	0/841	0	1/2628	0,03
Rifampicine	75/1114	6,7	22/507	4,3	97/1621	5,9
Cotrimoxazole	339/1448	23,4	106/643	16,5	445/2091	21,3
Acide fusidique	233/701	33,2	111/396	28	344/1097	31,3
Ofloxacinine	101/929	10,8	21/399	5,2	122/1328	9,1

### *III. Antagonisme des bactéries lactiques*

## **1. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques**

### **1. 2. Acides organiques**

Les bactéries lactiques sont sélectionnées pour leurs propriétés acidifiantes, phénomène déterminant dans l'inhibition des flores pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium*) et des microorganismes d'altération (*Pseudomonas*, *Brochotrix* et les entérobactéries) (Smith et Palumbo, 1983; Schillinger et Lücke, 1990). Leurs propriétés inhibitrices sont attribuées à la production d'acides organiques, notamment lactique et acétique. L'effet inhibiteur de ces acides est étroitement lié à la diminution du pH du milieu et à la fraction d'acide non dissociée. La diminution du pH cause une acidification du cytoplasme cellulaire (Kashket, 1987) qui se traduit par une inhibition de la flore acido-sensible telle que *Pseudomonas* (Talon *et al.*, 1980). La fraction acide non dissociée, étant lipophile, peut diffuser passivement à travers la membrane et dissiper le gradient électrochimique de protons ou altérer la perméabilité de la membrane ce qui engendrerait une perturbation des systèmes de transport de substrats (Ammor, 2004).

#### **1. 2. 1. Acide lactique**

L'acide lactique est le métabolite majeur produit par les bactéries lactiques. Au cours de la fermentation, ses formes dissociée et non dissociée sont en équilibre et l'amplitude de la dissociation dépend du pH. A bas pH, une grande quantité de l'acide lactique est maintenue sous sa forme non dissociée et elle est toxique pour de nombreuses bactéries, levures et moisissures. Lindgren et Dobrogosz (1990) ont montré qu'à différentes valeurs de pH, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la forme non dissociée était différente à l'encontre de *Clostridium tyrobutyricum*, *Enterobacter* sp. et *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. En outre, les stéréo-isomères d'acide lactique diffèrent aussi dans l'activité antimicrobienne. L'acide L(+)-lactique est plus inhibiteur que l'isomère D(-) (Benthin et Villadsen, 1995). Charlier *et al.* (2008) ont montré que l'acidification du lait par addition de l'acide lactique jusqu'à des valeurs de pH 4,5 – 4,4, empêche complètement la croissance de *Staphylococcus aureus*.

#### **1. 2. 2. Acide acétique**

L'acide acétique peut interagir avec les membranes cellulaires et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique (Huang *et al.*, 1986). Son activité antimicrobienne est plus efficace que celle de l'acide lactique étant donné sa plus grande valeur de pKa (acide lactique 3,08 et acide acétique 4,75) et son grand pourcentage en forme non dissociée par rapport

à l'acide lactique à un pH donné (**Earnshaw, 1992**). L'acide acétique agit de manière synergétique avec l'acide lactique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu favorisant ainsi l'augmentation de la toxicité de l'acide acétique (**Ammor, 2004**).

Certaines études ont montré qu'à pH 5, l'acide acétique avec sa forme non dissociée pouvait inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* (**Charlier et al., 2008**).

### **1. 3. Peroxyde d'hydrogène**

Il est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène comme résultat de l'action des flavoprotéines oxydases ou de la NADH peroxydase. L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène résulterait de l'oxydation des groupes sulfhydriles causant une dénaturation d'un grand nombre d'enzymes. Il résulterait aussi de la peroxydation des lipides membranaires augmentant ainsi la perméabilité de la membrane (**Kong et Davidson, 1980**). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être aussi un précurseur de la production de radicaux libres bactéricides comme les ions superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et hydroxyle (·OH). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski et Gessner, 1988**). *Lactobacillus paracasei* F2 produit 2,72mmol/l d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et il a été montré que la production de peroxyde d'hydrogène par des souches de *Lactobacillus* ou *Lactococcus* lors de cultures mixtes inhibait la croissance de *S. aureus* (**Ocaña et al., 1998 ; Ito et al., 2003 ; Otero et Nader-Macías, 2005**).

### **1. 4. Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)**

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies par inhibition des réactions enzymatiques de décarboxylation et l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans la bicouche lipidique membranaire pourrait causer un dysfonctionnement dans la perméabilité (**Eklund, 1984 ; Baliarda, 2003**).

### **1. 5. Composés aromatiques**

#### **1. 5. 1. Diacétyl**

C'est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram positif. Le diacétyl inhibe la croissance bactérienne en interagissant avec une protéine fixatrice d'arginine, ce qui affecte l'utilisation de l'arginine (**Motlagh et al., 1991**). Le diacétyl à 344 µg/ml inhibe les souches de *Listeria*, *Salmonella*,

*Yersinia*, *E. coli* et d'*Aeromonas* (Jay, 1986). Dans l'étude de Vinderola *et al.* (2002), à la concentration de 50ppm, le diacétyle a inhibé la croissance d'*Escherichia coli*.

### **1. 5. 2. Acétaldéhyde**

Il est produit par *Lb. delbruckii* ssp. *bulgaricus* par action d'une aldolase à thréonine, qui clive la thréonine en acétaldéhyde et glycine. Etant donné que *Lb. delbruckii* ssp. *bulgaricus* et *Sc. thermophilus* ne métabolisent pas l'acétaldéhyde dans le yaourt, il s'accumule dans le produit à une concentration de 25 ppm. L'acétaldéhyde à 10-100 ppm inhibe la croissance de *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* et *E. coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991).

### **1. 6. Acides gras**

Certains lactobacilles et lactocoques avec leurs activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras libres dans le lait fermenté (Rao et Reddy, 1984). Les acides gras insaturés sont actifs contre les bactéries à Gram positif et peuvent présenter une activité antifongique dépendante de la longueur des ramifications, la concentration et le pH du milieu (Gould, 1991). L'action antimicrobienne des acides gras serait due à la molécule non dissociée et pas à l'anion, étant donné que le pH a des effets profonds sur leur activité avec un effet bactéricide rapide à bas pH (Kabara, 1993). On a longtemps pensé que les membranes cellulaires sont les cibles primaires des acides gras antimicrobiens. On a démontré qu'ils étaient capables d'affecter la perméabilité cellulaire et le transport des nutriments et que des concentrations micromolaires de ces acides affectent l'activité des enzymes membranaires. Les acides gras insaturés sont également capables d'inhiber les organismes par auto-oxydation et formation de peroxydes et de radicaux (Wang et Johanson, 1992).

### **1. 7. Substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire**

Plusieurs études se sont intéressés à la production de substances antimicrobienne de faible poids moléculaire par les bactéries lactiques (Reddy *et al.*, 1983 ; Silva *et al.*, 1987). Ces substances partagent plusieurs caractéristiques, en plus d'avoir un faible poids moléculaire, elles sont actives à bas pH, solubles dans l'acétone, thermostables et montrent un large spectre d'activité (Axelsson, 1990). Jusqu'ici, trois substances ont été décrites, Reutéline et Reutélinecycline, toutes les deux sont produites par *Lb. reuteri* et le 2-Pyrrolidone- acide 5-carboxylic, produit par *Lb. casei* ssp. *casei*, *Lb. casei* ssp. *pseudoplantarum* et *Streptococcus bovis* (Chen et Russell, 1989; Huttunen *et al.*, 1995). Les organismes les plus sensibles à la

Reutéline incluent des espèces des genres *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Candida* et *Trypanasoma* (Axelsson *et al.*, 1989).

### **1. 8. Bactériocines**

Les bactériocines sont des peptides ou des complexes de peptides (généralement 30 à 60 acides aminés) synthétisés au niveau des ribosomes et qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique sur d'autres espèces souvent taxonomiquement proches (Klaenhammer, 1988 ; Garneau *et al.*, 2002). Dans tous les cas, la cellule productrice est immunisée vis-à-vis de l'action de sa propre bactériocine.

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont été classées par Klaenhammer (1993) en quatre classes sur la base de leur poids moléculaire, thermostabilité, sensibilité enzymatique, présence d'acides aminés post-traductionnellement modifiés et mode d'action.

**1. 8. 1. Classe I :** regroupe les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux groupes :

**Groupe Ia :** comprend des peptides cationiques, hydrophobes, allongés et contenant jusqu'à 34 acides aminés.

**Groupe Ib :** comprend les peptides globulaires, chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe et hill, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002).

Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147. (Figure 1, Annexe 1).

**1. 8. 2. Classe II :** peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois groupes.

**Groupe IIa :** contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland *et al.*, 2000). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de ce groupe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine

C-terminal qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (**Eijsink *et al.*, 1998 ; Richard *et al.*, 2006**).

**Groupe IIb :** comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de groupe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires (**Dortu et Thonart, 2009**).

**Groupe IIc :** selon **Calo-Mata *et al.* (2008)**, ce groupe consiste en des bactériocines sécrétées par la voie générale de sécrétion ou « *sec-dependent secreted bacteriocins* » qui inclue toutes les bactériocines de classe II n'appartenant ni au groupe IIa ni au groupe IIb dont l'acidocine B et l'entérocyne A.

**1. 8. 3. Classe III :** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysine A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocine A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericine B produite par *Streptococcus milleri* (**Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2007**).

**1. 8. 4. Classe IV :** Protéines complexes, glycoprotéines ou lipoprotéines, nécessitant une entité non protéique pour leur activité (**Oscariz et Pisabarro, 2001**).

D'après **Calo-Mata *et al.* (2008)**, la classe IV englobe les peptides cycliques nécessitant des entités glucidiques ou lipidiques pour leur activité. Peu est connu sur la structure et le mode d'action de ces bactériocines. Se sont des bactériocines caractérisées par l'existence d'une liaison covalente entre les extrémités N et C-terminales de la chaîne polypeptidique et à ce jour uniquement 7 bactériocines circulaires synthétisées par diverses bactéries à Gram positif, sont rapportées (**Martin-Visscher *et al.*, 2008**). Dans le cas de bactéries lactiques, elle inclue la leuconocine S, la lactocine 27 (**Calo-Mata *et al.*, 2008**) et la carnocycline A (**Martin-Visscher *et al.*, 2008**).

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries à Gram positif, mais quelques travaux ont montré que certaines d'entre elles ont une activité contre des bactéries à Gram négatif exemple de la bactériocine (JW15BZ) produite par *Lb. fermentum* qui inhibe la croissance de *Klebsiella pneumoniae* (Von Mollendorff *et al.*, 2006).

Il est généralement admis que les bactériocines agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en s'y insérant et en s'y regroupant, causant ainsi la formation de pores et donc une fuite d'ions, d'ATP et d'autres métabolites (Deegan *et al.*, 2006) (Figure 2, Annexe 1). Par conséquent, la force protonmotrice (PMF) des cellules sensibles diminue ou s'épuise (Montville et Chen, 1998). Le tableau V montre des exemples de bactériocines et leur spectre d'action sur *Staphylococcus aureus*.

**Tableau VII** Exemples de bactériocines de bactéries lactiques et leur spectre d'action sur *Staphylococcus aureus* (Charlier *et al.*, 2009)

BL (bactériocines)	Spectre d'inhibition/activité sur <i>S. aureus</i> (+/-)
<i>Lactococcus</i> sp.  Nisine Lacticine 3147 Lacticine 481 Lactococcine A, B et M	  Large spectre (+) Large spectre (+) Spectre moyen (nd) Spectre étroit (-)
<i>Lactobacillus</i> sp.  Lactocine 27 Sakacine A Sakacine B Plantaricine C Curvaticine 13	  Spectre étroit (nd) Spectre étroit (nd) Spectre étroit (nd) Large spectre (nd) Large spectre (nd)
<i>Pediococcus</i> sp.  Pediocine A Pediocine AcH (PA-1)	  Large spectre (+) Large spectre (+)
<i>Leuconostoc</i> sp.  Leucocine A-UAL187	  Large spectre (nd)
<i>Enterococcus</i> sp.  Entéroccine A Entéroccine P	  Spectre étroit (-) Large spectre (+)
<i>Carnobacterium</i> sp.  Carnocine H Piscicoline 126 Divercine V41	  Large spectre (+) Large spectre (-) Large spectre (nd)

+, inhibition de *S. aureus*

-, aucune inhibition de *S. aureus*

nd, activité indéterminée sur *S. aureus* ou non mentionnée dans les études caractérisant ces bactériocines.

# *Partie pratique*

# *Matériel et méthodes*

## **I. Isolement des souches de *Staphylococcus aureus***

### **1. A partir des selles**

#### **1. 1. Provenance des échantillons**

Cinquante- huit (58) échantillons de selles sont prélevés à partir de patients diarrhéiques soumis à une antibiothérapie au niveau des différents services de l'hôpital d'Amizour (médecine interne, chirurgie et pédiatrie).

Les prélèvements de selles sont collectés stérilement dans des boites de coproculture, puis acheminés dans l'heure au laboratoire.

Les renseignements ci-dessous sont recueillis pour chaque patient

- Age et sexe
- Antibiotiques administrés
- Service hospitalier

#### **1. 2. Isolement**

Une noix de selles est diluée dans un tube contenant 5ml de milieu Chapman liquide. 1ml d'huile de vaseline est ajouté à la surface, puis le tube est incubé à 37°C pendant 24 h. A partir du bouillon trouble, un ensemencement par inondation de la surface d'une boite de gélose Chapman est effectué, puis l'excès est rejeté. La boite de Pétri est incubée à 37°C pendant 24 h (**Figure 5**).

## **2. A partir de lait de vaches mammites**

### **2. 1. Provenance des échantillons**

Dix-sept (17) échantillons de lait de vaches mammites (après traitement aux antibiotiques) sont aseptiquement collectés à partir de différentes fermes de la région d'Amizour. Ces derniers sont immédiatement transportés dans une glacière puis analysés au laboratoire.

Les données ci-dessous sont recueillies

- Type de mammité
- Aspect du lait
- Antibiotiques administrés

## **2. 2. Isolement**

1ml d'échantillon de lait est ensemencé dans un tube contenant 9ml de milieu Giolitti et Cantoni additionné de tellurite de potassium. 1ml d'huile de vaseline est ajouté à la surface du milieu, puis le tube est incubé à 37°C pendant 24 h. Après noircissement du bouillon, un ensemencement par stries sur la surface d'une boîte de gélose Chapman est réalisé. La boîte de Pétri est incubée à 37°C pendant 24 h (**Figure 6**).

## **II. Purification et identification des souches de *Staphylococcus aureus***

Après incubation, les colonies sont sélectionnées sur la base de leur aspect morphologique (couleur jaune doré, bords réguliers, bombées, luisantes et un diamètre de 1 à 3mm) (**Sutra et al., 1998**). Ces dernières sont repiquées successivement au moins 3 à 4 fois sur gélose Chapman dans le but de les purifier.

L'identification des souches de *Staphylococcus aureus* est réalisée par l'utilisation de 4 tests principaux :

### **1 Coloration de Gram**

### **2 Test de la catalase**

### **3 Test de la coagulase**

### **4 Test de la DNase**

#### **▪ Test de la coagulase**

- Ensemencement à partir d'une colonie caractéristique sur milieu chapman d'un bouillon BHI (cœur cerveau) puis incubation 24 h à 37°C au bain-Marie.

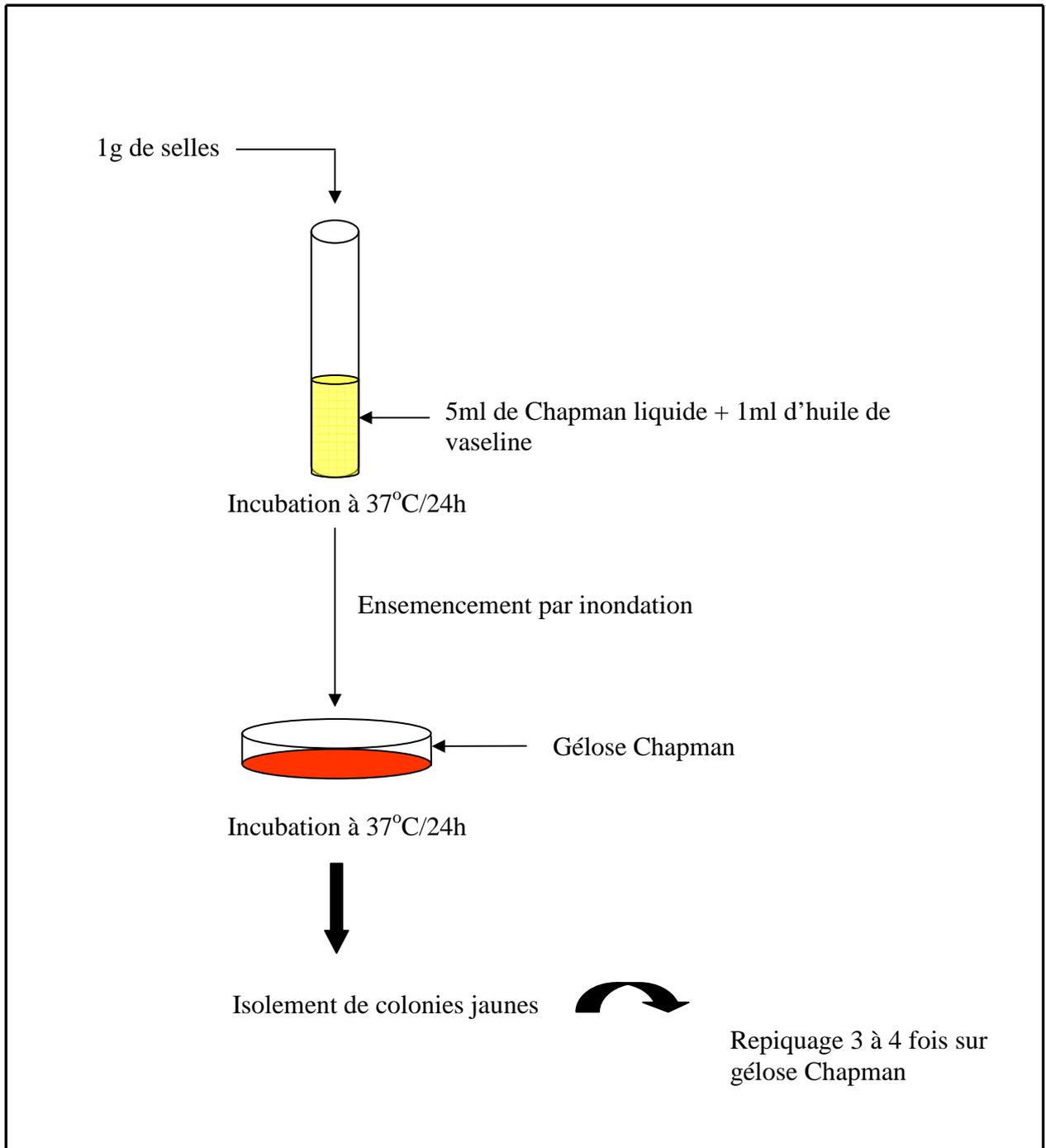
- 0,5ml de plasma de lapin oxalaté sont répartis dans des tubes à hémolyse stériles, puis 0,5 ml de chaque bouillon BHI présentant un trouble sont stérilement ajoutés.

- Les tubes sont mélangés au vortex puis incubés à 37°C. L'observation se fait toutes les heures pendant 8 heures puis au bout de 24 h. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum (**Guiraud et Rosec, 2004**).

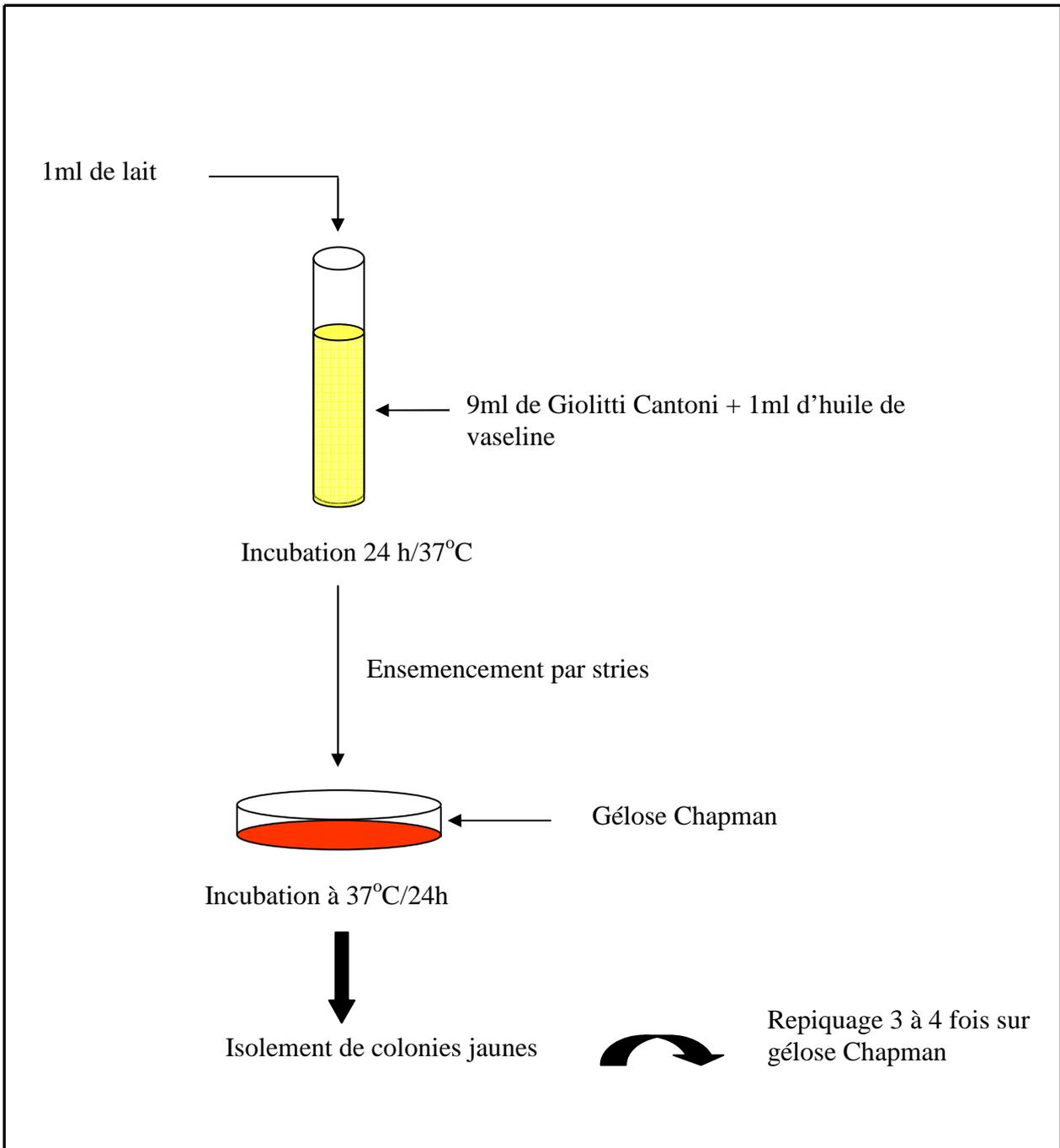
#### **▪ Test de la DNase**

- A partir des colonies caractéristiques sur Chapman, une gélose à ADN est ensemencée par strie centrale, puis les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h.

- La révélation de l'activité se fait en vaporisant à la surface de la gélose une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N). L'apparition d'une zone claire autour de la strie indique la présence d'une DNase (**Guiraud et Rosec, 2004**).



**Figure 5** Isolement de *Staphylococcus aureus* à partir des selles



**Figure 6** Isolement de *Staphylococcus aureus* à partir de lait mammitieux

### III. Sélection des souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes

#### 1. Préparation de l'inoculum standard de *S. aureus*

L'activité de tout agent antibactérien est dépendante de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée (Leroy et De Vuyst, 2005). Ainsi, l'inoculum de la souche de *S. aureus* est standardisé.

A partir d'une culture fraîche, obtenue sur bouillon nutritif, un ensemencement par stries est réalisé sur gélose Chapman. Après incubation à 37°C pendant 18 h, les colonies sont prélevées et reprises dans un tube d'eau physiologique, jusqu'à avoir une densité optique fixée à : 0,5 à 625 nm (spectro Shimadzu UV mini 1240). Ensuite des dilutions décimales ont été réalisées dans de l'eau physiologique ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ), à partir des dilutions préparées ( $10^{-6}$  jusqu'à  $10^{-8}$ ), 1ml de chaque dilution a été ensemencé en masse dans une gélose PCA, puis incubé à 37°C pendant 24h. Au terme de l'incubation le dénombrement des colonies est réalisé (Figure 7).

#### 2. Antibiogrammes des souches de *S. aureus*

Dans le but de sélectionner les souches de *S. aureus* multirésistantes, parmi celles isolées des selles et du lait mammiteux, ces dernières ont fait l'objet d'un antibiogramme standard sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CA-SFM (2009). Pour étudier la résistance du *Staphylococcus aureus* à la méthicilline, il est recommandé d'utiliser la céfoxitine comme marqueur phénotypique pour la détection de la résistance et d'incuber à 30°C au lieu de 37°C (Fernandes et al., 2005).

Le tableau VIII résume quelques caractéristiques des antibiotiques testés

**Tableau VIII** Antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour *Staphylococcus aureus* (CA-SFM, 2009)

Antibiotiques	Abréviations	Classes	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
				S	R
Pénicilline G	P	Pénicillines	6 µg	≥ 29	< 29
Oxacilline	OX	Pénicillines	5 µg	≥ 20	< 20
Céfoxitine	FOX	Céphalosporines	30 µg	≥ 27	< 25
Céfotaxime	CTX	Céphalosporines	30 µg	≥ 26	< 23
Gentamycine	GM	Aminosides	15 µg	≥ 20	< 20
Erythromycine	E	Macrolides	15 UI	≥ 22	< 19
Pristinamycine	PT	Streptogramines	15 µg	≥ 22	< 19
Vancomycine	VA	Glycopeptides	30 µg	≥ 17	-
Ciprofloxacine	CIP	Fluoroquinolones	5 µg	≥ 22	< 19

S : sensible R : résistant

## **2. 1. Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture pure et fraîche de 18 heures, les colonies de *S. aureus* isolées sont raclées à l'aide d'une anse de platine, l'anse est ensuite déchargée dans 5ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, les *inocula* sont ajustés jusqu'à obtenir une DO de 0,50 à 625nm (environ  $10^8$  UFC/ml). Une dilution à  $10^{-1}$  est effectuée, pour avoir  $10^7$  UFC/ml.

## **2. 3. Ensemencement**

Selon CA-SFM, (2009) :

- 1- Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne à  $10^7$  UFC/ml
- 2- L'écouvillon est essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- 3- Sur une boîte de Pétri présentant 4mm d'épaisseur de gélose Mueller Hinton, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface de la gélose de haut en bas et en stries serrées
- 4- L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de  $60^\circ$  à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- 5- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- 6- Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose Mueller Hinton, incubée à  $30^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 heures.

## **2. 4. Lecture**

Après incubation, on mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (2009).

### **Remarque :**

Les deux souches de *S. aureus* ayant témoigné d'une multirésistance (l'une isolée de selles et l'autre de lait mammitieux) sont retenues pour la suite de l'étude.

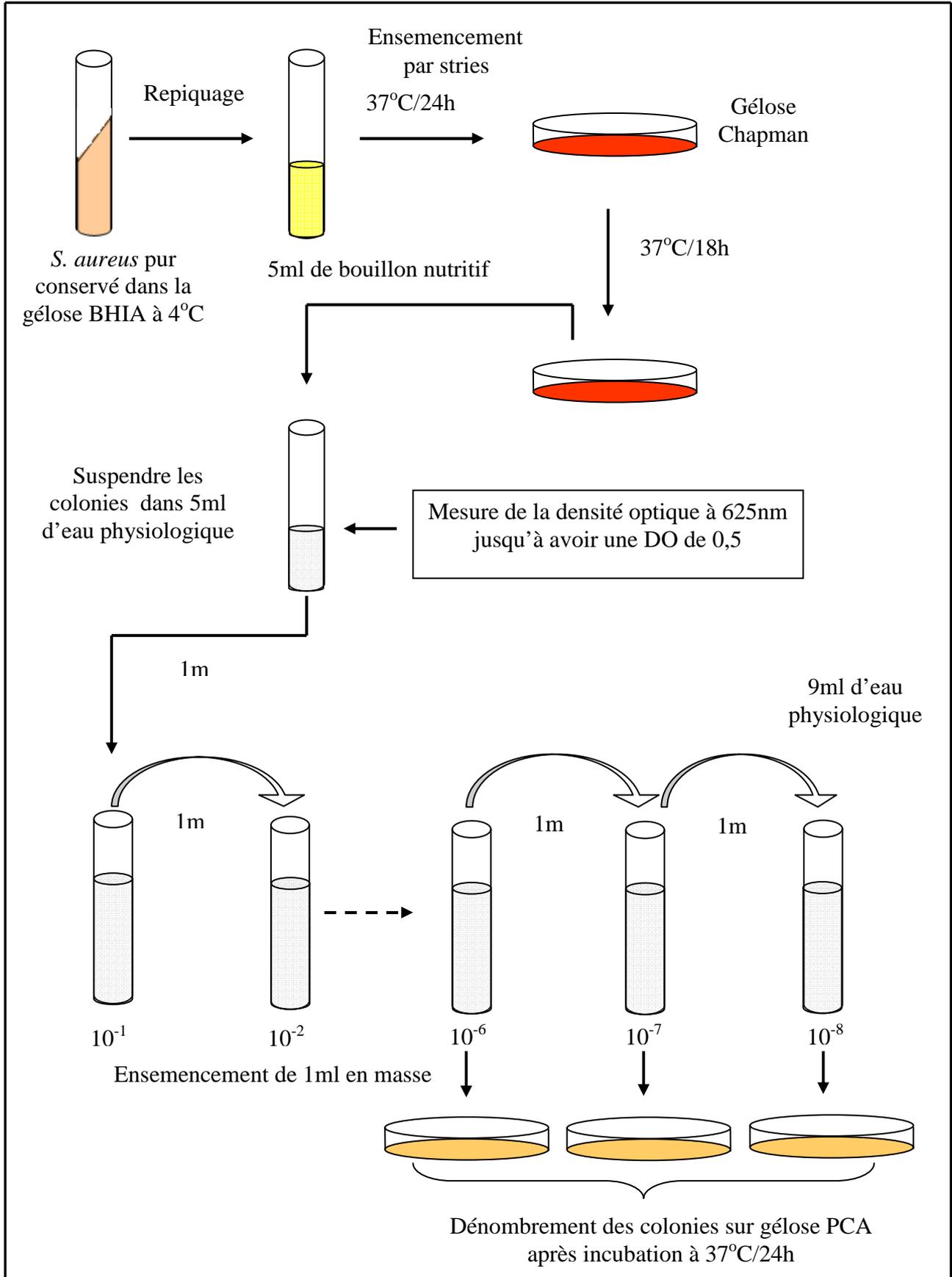


Figure 7 Standardisation de l'inoculum de *Staphylococcus aureus*

## **IV. Mise en évidence de l'activité antibactérienne *in vitro* de souches de bactéries lactiques à l'égard des souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques**

### **1. Souches de bactéries lactiques utilisées**

Six (6) souches de bactéries lactiques ont été utilisées durant cette étude.

- *Enterococcus faecalis* (1)

- *Enterococcus faecalis* (2)

- *Enterococcus* sp.

- *Lc. Lactis* ssp. *lactis* (1)

- *Lc. lactis* ssp. *lactis* (2)

- *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*

Ces dernières ont été identifiées par séquençage de leurs ARN 16S (**Bendali, 2009**), et font partie de la collection bactérienne du Laboratoire de Microbiologie de lait et probiotique de l'université A. Mira de Béjaia.

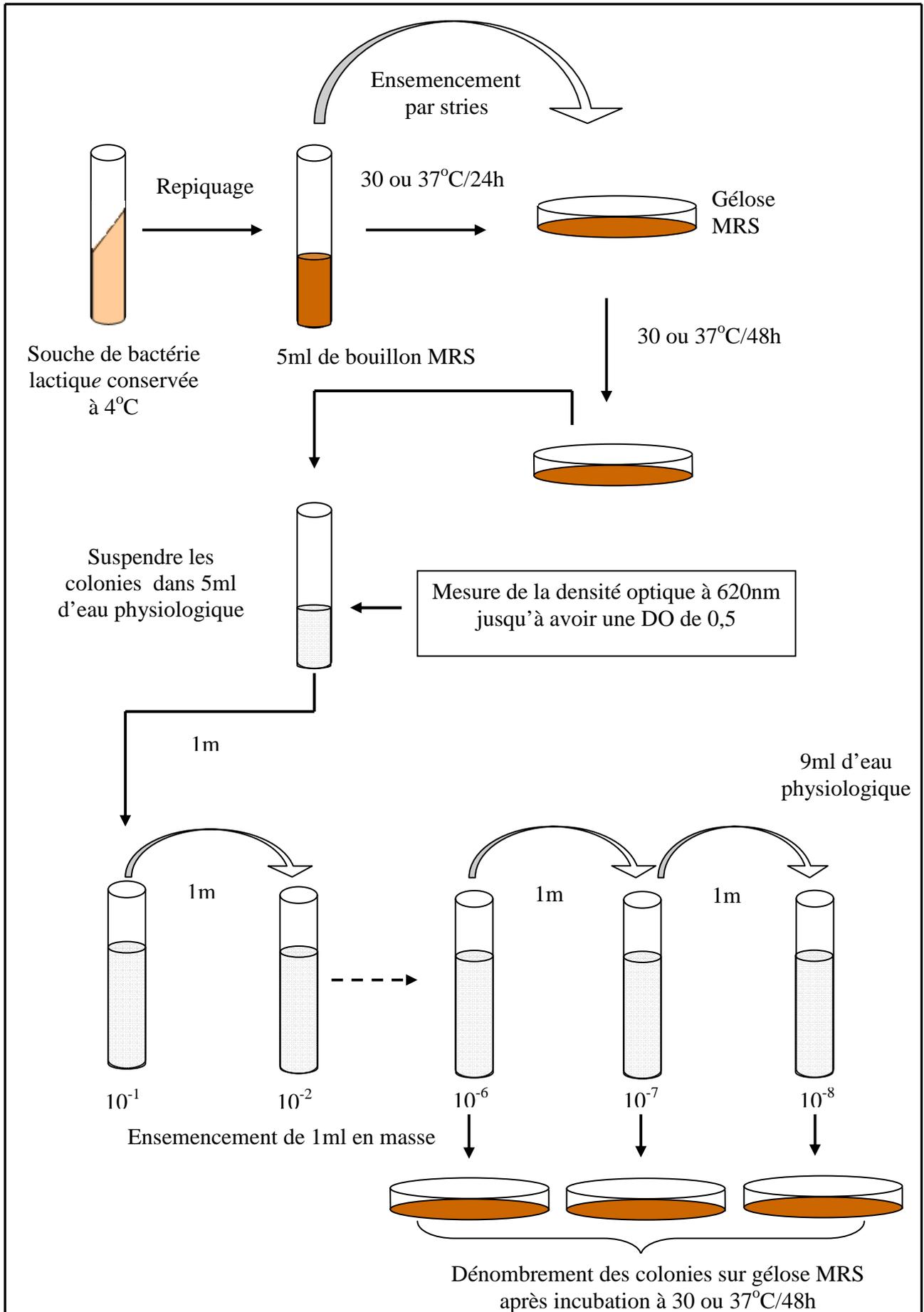
Avant toute utilisation des souches, une vérification de leur pureté est indispensable. Après quelques repiquages successifs, des tests rapides et simples permettent de vérifier la pureté des souches :

- Aspect des colonies obtenues après isolement sur gélose MRS à 37°C pendant 48 h pour les souches (*Lb. paracasei*, *Enterococcus faecalis* (1), *Enterococcus faecalis* (2) et *Enterococcus* ssp.), et à 30°C pendant 48h pour *Lc. lactis* (1) et *Lc. lactis* (2).
- Coloration de Gram et test de la catalase

### **2. Préparation de l'*inoculum* standard des bactéries lactiques**

Afin de pouvoir comparer l'aptitude des différentes souches de bactéries lactiques à produire des substances antimicrobiennes, une standardisation des conditions de culture est indispensable. Pour cela les *inocula* des souches testées sont standardisés à 10<sup>9</sup> UFC/ml. A partir d'une culture fraîche, obtenue dans 5ml de bouillon MRS, un ensemencement est réalisé sur le même milieu gélosé. Après 48 h d'incubation à 30 ou 37°C, les colonies isolées sont raclées à l'aide d'une anse de platine, l'anse est ensuite déchargée dans 5ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, les *inocula* sont ajustés jusqu'à obtenir une DO de 0,50 à 620nm (specro Shimadzu UV mini 1240). Ensuite des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-8</sup>), à partir des dilutions préparées (10<sup>-6</sup> jusqu'à 10<sup>-8</sup>), 1ml de chaque dilution est ensemencé en masse dans une gélose MRS, puis incubé à 30 ou 37°C pendant 48h.

Au terme de l'incubation le dénombrement des colonies est réalisé (**Figure 8**).



**Figure 8** Standardisation de l'*inoculum* des bactéries lactiques

### **3. Test des spots**

L'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques à l'égard de *S. aureus* est mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test des spots. Après avoir rempli les boîtes de Pétri avec de la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5µl de la suspension bactérienne de la souche de bactérie lactique ( $10^8$  UFC/ml) sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées près du bec bunsen pendant 30 min puis incubées à 30 ou 37°C pendant 18 h (**Fernández *et al.*, 2007**). Après la période d'incubation, les spots sont recouverts de 10 ml d'une gélose semi-molle de PCA en surfusionensemencée avec 1ml d'une culture fraîche de la souche de *S. aureus* à  $10^7$  UFC/ml, puis incubées à 37°C pendant 18 h. Au terme de la période d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés (**Figure 9**).

La souche de bactéries lactiques ayant témoigné de la meilleure antibiose vis-à-vis des souches de *S. aureus*, sera retenue pour des tests *in vitro* et *in vivo*.

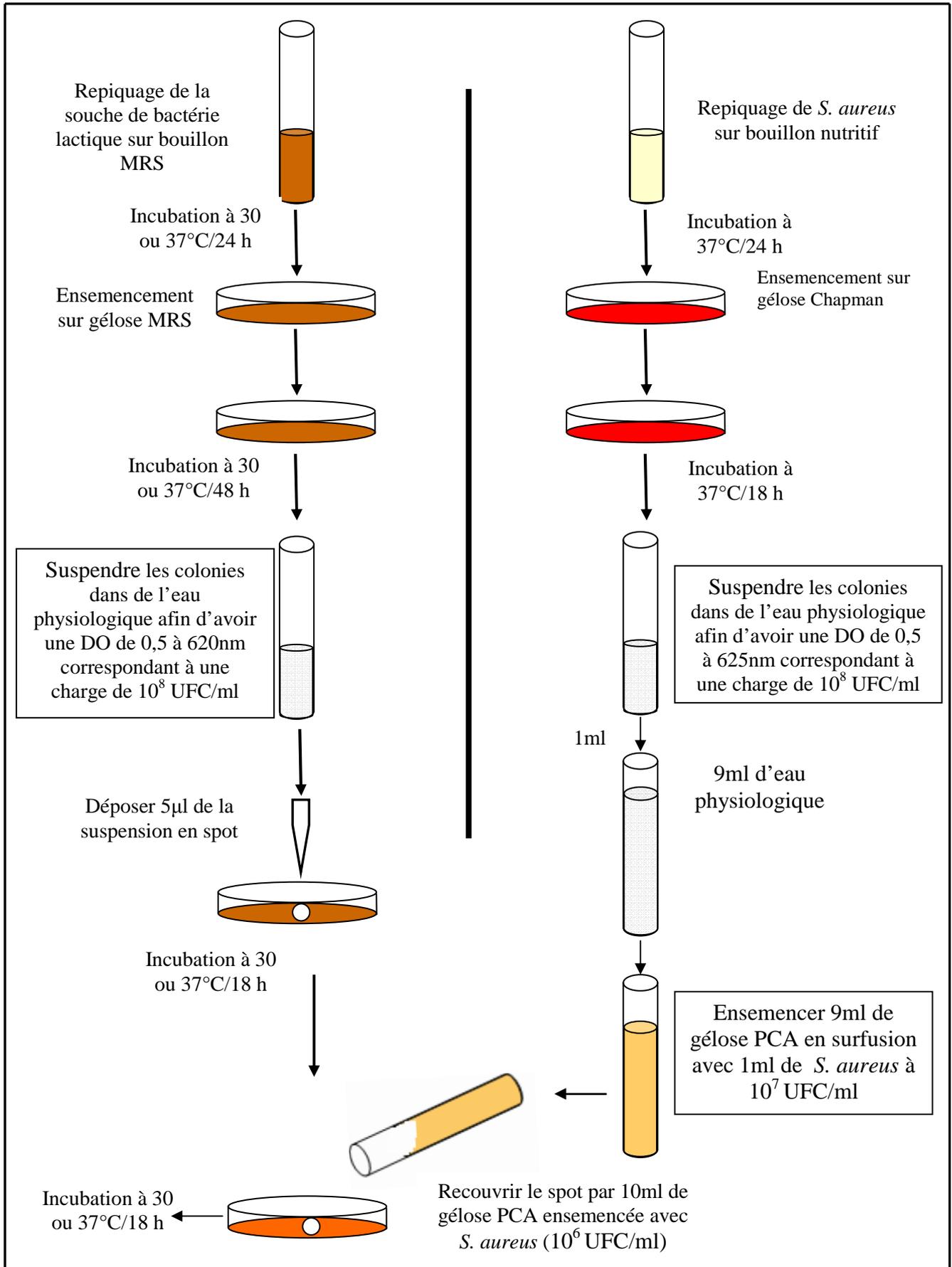


Figure 9 Schéma du test des spots

#### **4. Mesure de la concentration extracellulaire des ions K<sup>+</sup>**

Pour savoir si la souche de bactérie lactique retenue a un impact sur la perméabilisation de la membrane de *S. aureus* exprimé par la fuite des ions K<sup>+</sup> du contenu cytoplasmique, la concentration externe de ces derniers est mesurée dans les surnageants des cultures mixtes et pures (témoins) par spectrophotométrie de flamme. Cet appareil est principalement utilisé pour le dosage des cations alcalins Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>+2</sup>.

##### **4. 1. Préparation des cultures mixtes**

Deux Erlen-Meyer de 100 ml sont remplis par 16ml de bouillon BHI, puis inoculés par 2ml de la suspension de la souche de bactérie lactique retenue à 10<sup>9</sup> UFC/ml. Le premier Erlen-Meyer estensemencé par 2ml de la suspension de la 1<sup>ère</sup> souche de *S. aureus* retenu, le second par 2ml de la suspension de la 2<sup>ème</sup> souche de *S. aureus* à des taux de 10<sup>7</sup> UFC/ml (**Figure 10**).

##### **4. 2. Préparation des cultures pures (témoins)**

Les cultures sont réalisées dans des Erlen-Meyer de 100ml contenant chacun 18ml de bouillon BHI.

- Le premier Erlen-Meyer est inoculé par 2ml de la suspension de la 1<sup>ère</sup> souche de *S. aureus* retenu à 10<sup>7</sup> UFC/ml.
- Le deuxième Erlen-Meyer est inoculé par 2ml de la suspension de la 2<sup>ème</sup> souche de *S. aureus* retenu à 10<sup>7</sup> UFC/ml.
- Le troisième Erlen-Meyer est inoculé par 2ml de la suspension de la bactérie lactique retenue à 10<sup>9</sup> UFC/ml.

L'incubation des cultures pures et mixtes, est effectuée à 37°C sous agitation de 180rpm pendant 4 heures. Des prélèvements de 3ml à un intervalle de 1 heure sont effectués, puis centrifugés à 6000tr/min. Les surnageants sont récupérés afin de mesurer la concentration des ions K<sup>+</sup> par le photomètre de flamme (**Figure 10**).

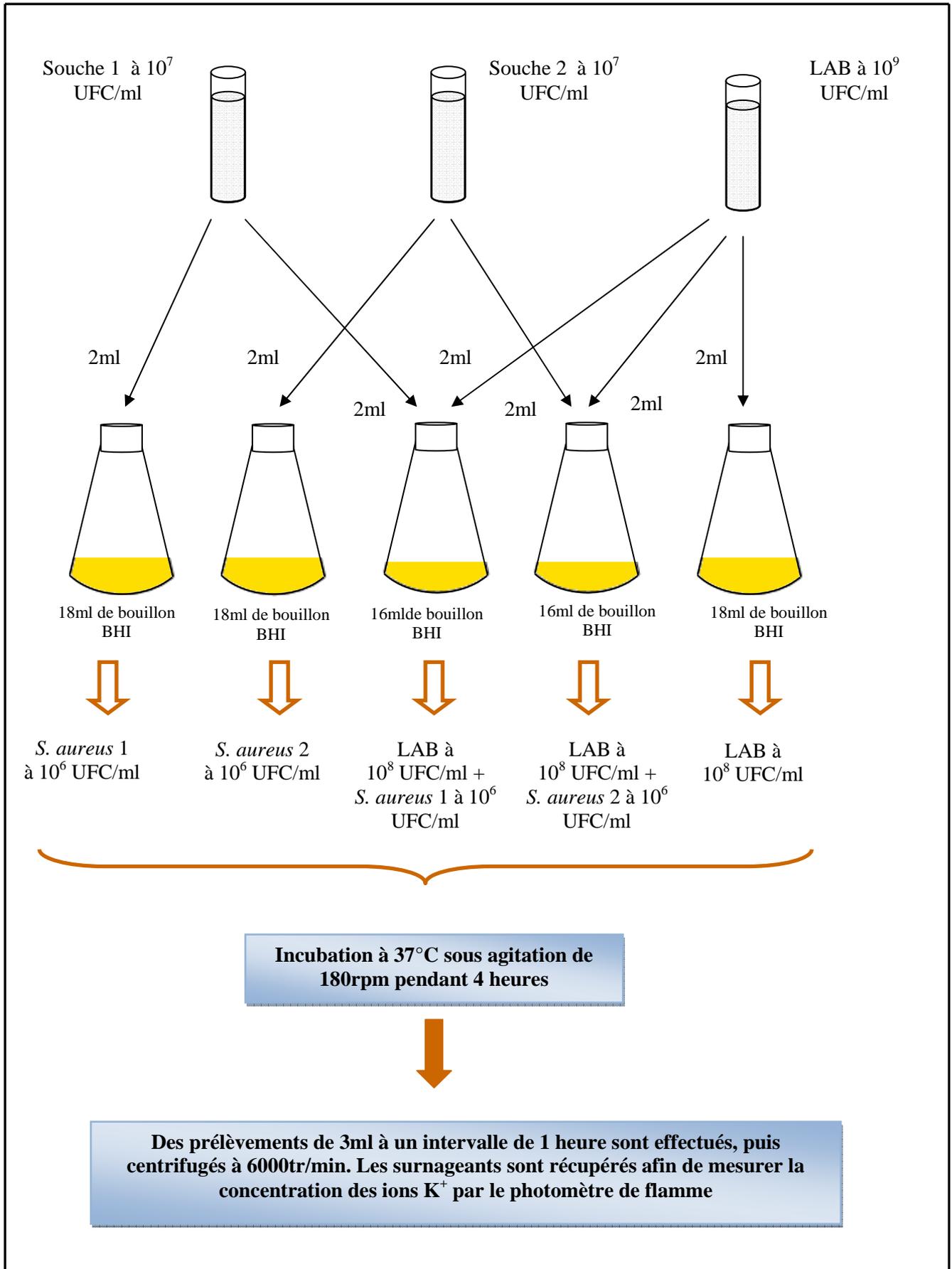


Figure 10 Mesure de la concentration extracellulaire des ions  $K^+$

#### **4. 2. Etablissement de la courbe d'étalonnage**

1,91g de KCl (chlorure de potassium), sont dissout dans une fiole de 1l, puis complétés avec de l'eau distillée. Une solution de 1 g/l de  $K^+$  est obtenue. A partir de la solution mère, des dilutions sont préparées (5 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l, 12 mg/l, 14 mg/l et 20 mg/l), ces dernières sont dosées au photomètre de flamme après que celui-ci soit calibré par le passage d'une solution d'eau distillée pure. La courbe d'étalonnage est tracée : Absorbance = f ( $[K^+]$  en mg/l)

Les surnageants des cultures centrifugés sont dosés en l'état afin de déterminer s'il est nécessaire de les diluer. Si c'est le cas, ils seront dilués puis à nouveau dosés de manière à rentrer dans la gamme d'étalon.

#### **5. Etude de l'antagonisme de la souche de LAB envers les souches de *S. aureus* dans du lait écrémé**

L'étude de l'antagonisme *in vitro* de la souche de LAB à l'égard des deux souches de *S. aureus* est effectuée en culture mixte dans du lait écrémé « Candia », afin d'évaluer le potentiel inhibiteur de LAB à l'égard des deux *S. aureus*. Les cultures mixtes de LAB à  $10^9$  UFC/ml et des deux souches de *S. aureus* à des taux de  $10^6$  UFC/ml, sont réalisées dans des tubes de 8ml de lait écrémé stérile. Les cultures pures (témoins), sont effectuées dans des tubes contenant 9ml de lait écrémé stérile, inoculés par chaque souche de *S. aureus* à des concentrations finales de  $10^6$  UFC/ml. Les cultures pures et mixtes, sont incubées à  $37^\circ\text{C}$ , puis des prélèvements à un intervalle de 2 heures sont effectués durant 24 heures, afin de suivre l'évolution du pH et le nombre de *S. aureus* par comptage des colonies sur gélose PCA (**Figure 11**).

La souche de *S. aureus* qui aura témoigné d'une plus grande sensibilité vis-à-vis de LAB lors de l'étude *in vitro*, sera retenue pour l'expérimentation *in vivo* sur lapins holoxéniques.

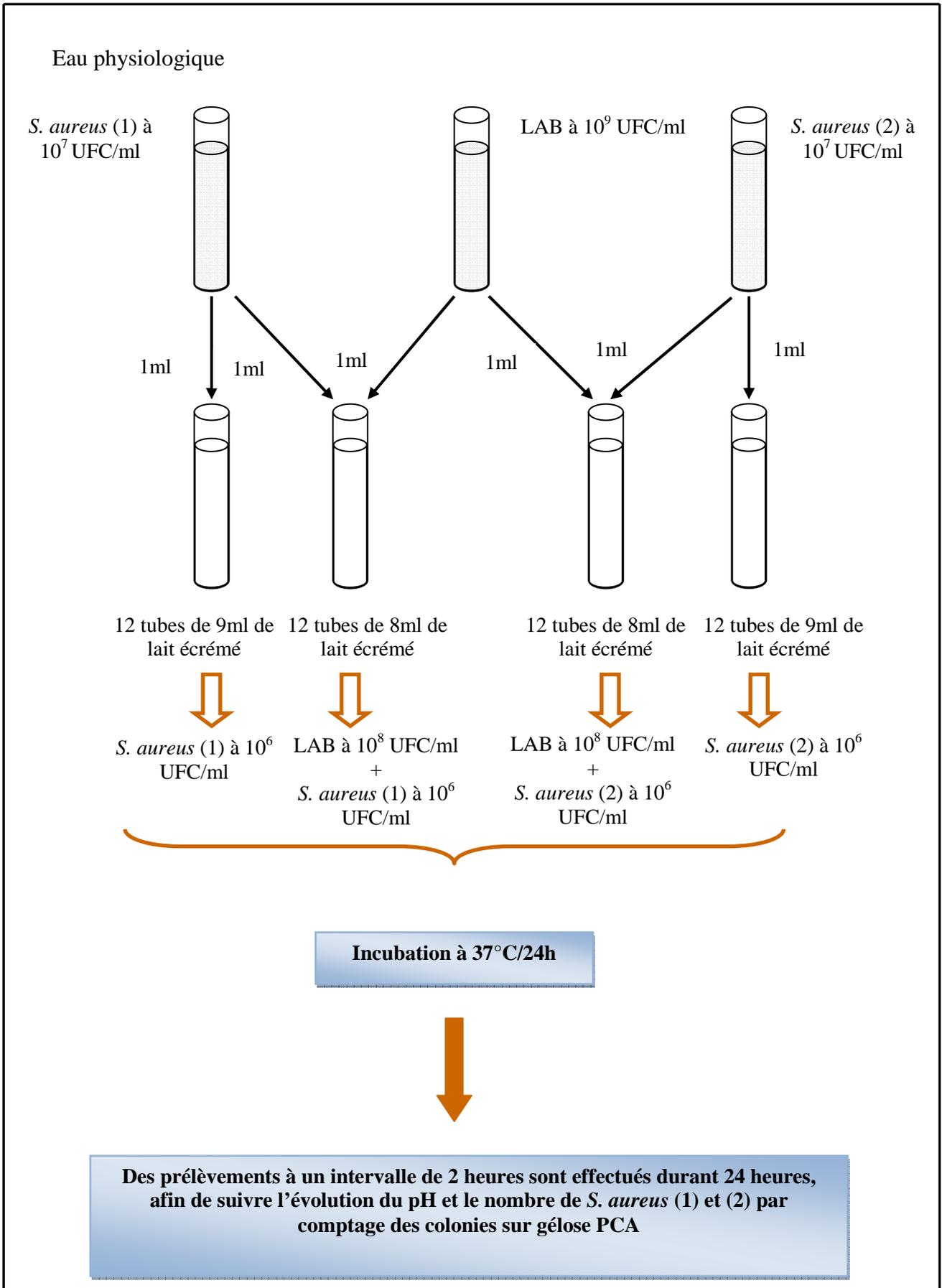


Figure 11 Cultures pures et mixtes des deux souches de *S. aureus* dans du lait écrémé

## **V. Etude *in vivo* de l'antagonisme de LAB envers la souche de *S. aureus* retenue**

### **1. Standardisation des *inocula***

Avant de procéder à l'expérimentation animale, une standardisation des *inocula* de la souche test (LAB) et de la souche cible (*S. aureus* retenue) dans du lait écrémé est effectuée (Figures 12 et 13).

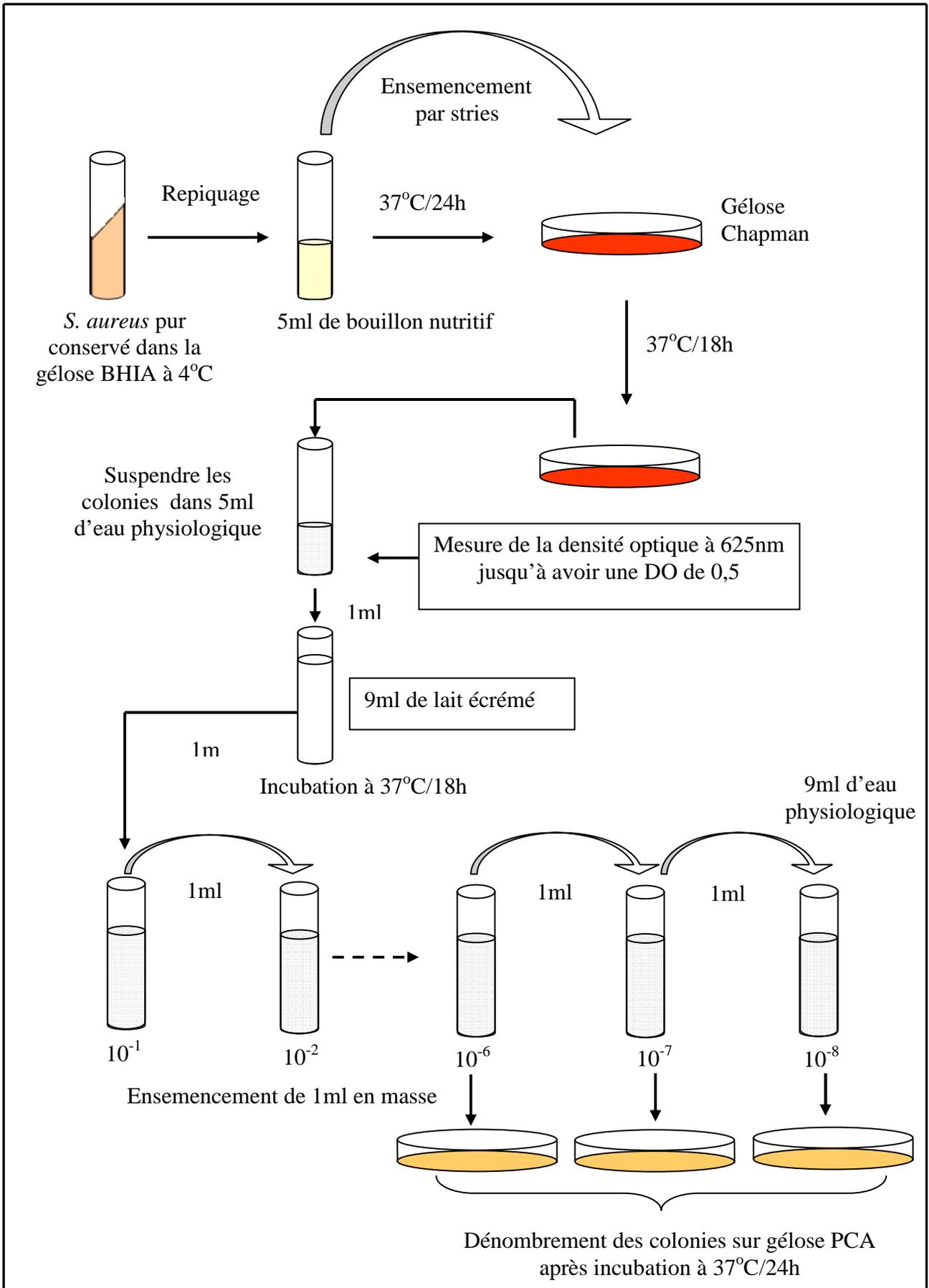


Figure 12 Standardisation de l'inoculum de *S. aureus* dans du lait écrémé

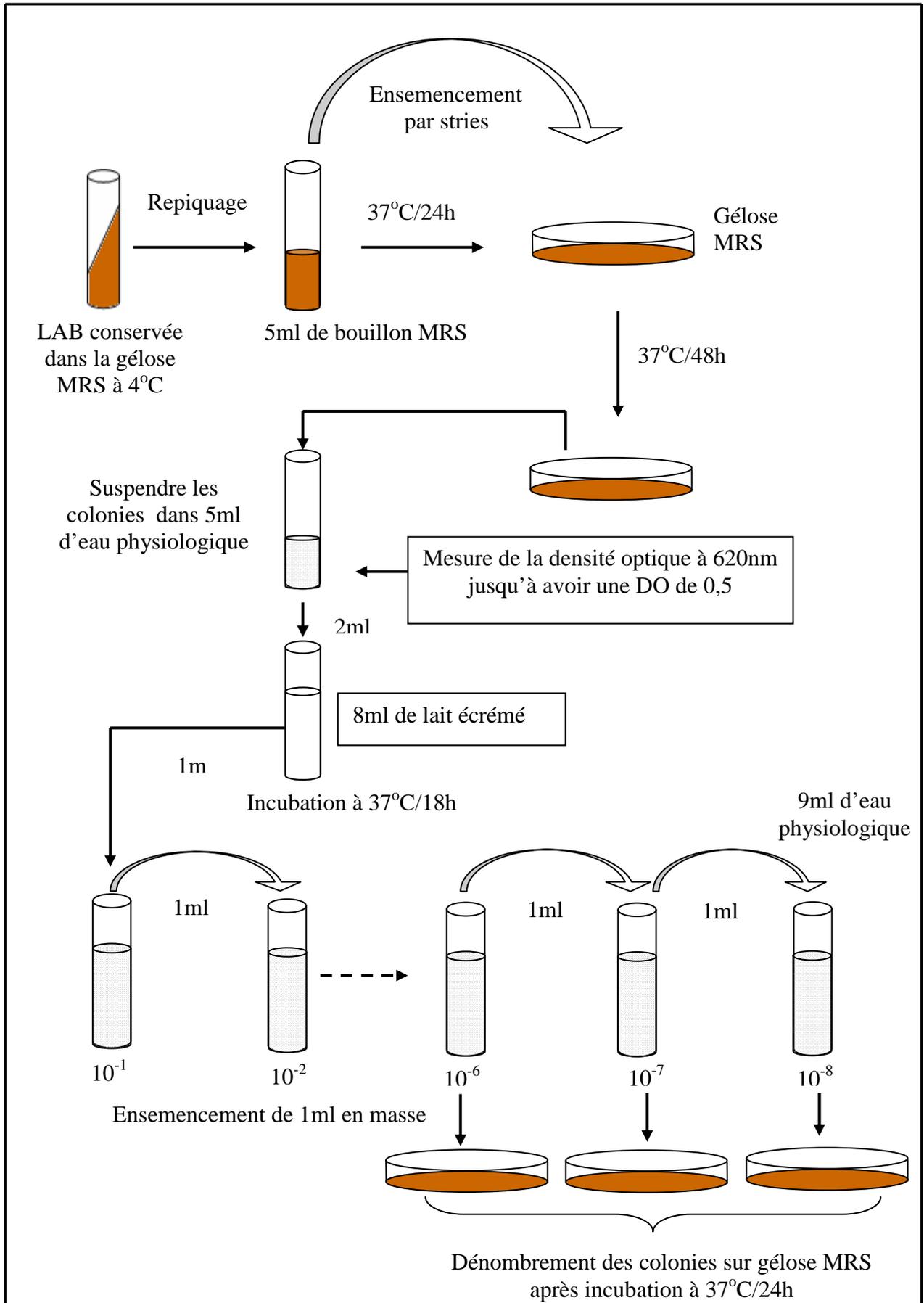


Figure 13 Standardisation de l'inoculum de LAB dans du lait écrémé

## **2. Préparation des animaux d'expérimentation**

L'étude a porté sur 10 lapins blancs holoxéniques, âgés de 30 jours, provenant de la région d'Amizour de la wilaya de Béjaia. Ces derniers sont répartis en deux lots de quatre lapins et un lot de deux lapins utilisés comme témoins (un diarrhéique et un autre sans aucun traitement). L'élevage de ces lapins est effectué au niveau de l'animalerie (FSNV) de l'université de Béjaia. Ils sont d'abord installés, dans le milieu qui leur était réservé, une semaine avant de commencer l'étude *in vivo* pour éviter toute instabilité de leur microflore intestinale qui serait due au stress ou au régime alimentaire. Chaque lapin est placé seul dans une cage conçue pour ce genre d'expérimentation. Ces animaux ont reçu une alimentation ordinaire microbiologiquement non contrôlée (herbes et eau de robinet).

## **3. Estimation du nombre des staphylocoques dans la flore fécale**

Avant de contaminer les lapins par *S. aureus*, une estimation du nombre des staphylocoques dans la flore fécale, est effectuée sur gélose Chapman (**Figure 14**).

## **4. Provocation de la diarrhée**

La diarrhée est provoquée par l'administration par voie orale d'une dose journalière de 5 ml de lait écrémé stérile « Candia » contenant  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml de *S. aureus* « préferment ». Le « préferment » de *S. aureus* est préparé tous les jours durant la période de contamination (5 jours) (**Figure 12**).

## **5. Traitement**

Juste après l'apparition de la diarrhée, les lapins sont traités comme suit:

- Lot 1 (non traité) : les lapins recevaient 5 ml de lait écrémé stérile par voie orale.
- Lot 2 (traité) : les lapins recevaient 5 ml de lait écrémé fermenté par LAB à  $2 \cdot 10^9$  UFC/ml.

Ce lait fermenté est préparé quotidiennement durant la période du traitement (7 jours) (**Figure 13**).

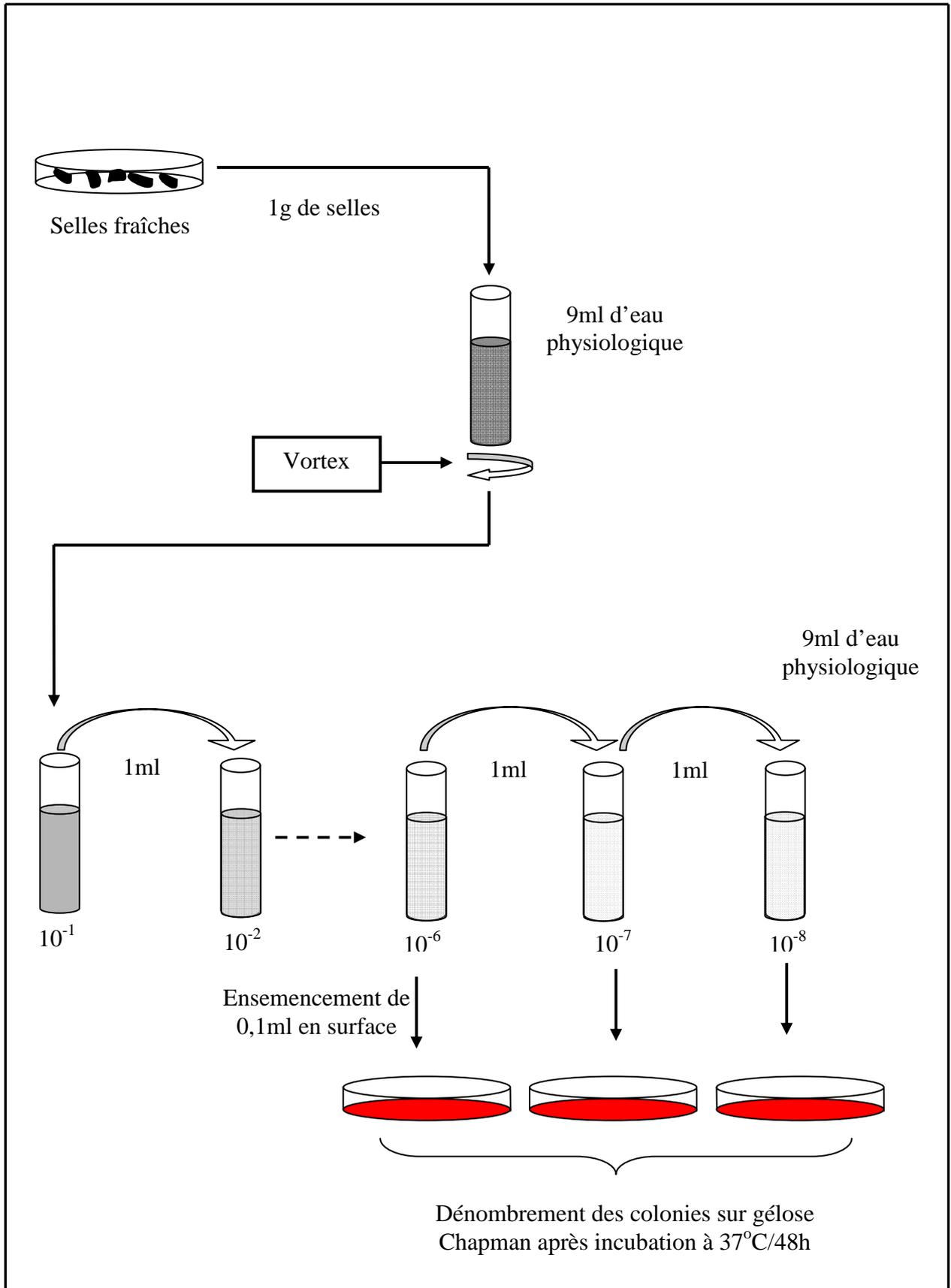


Figure 14 Protocole de dénombrement de *S. aureus* dans les selles des lapins

## 6. Dénombrement de *S. aureus* dans les selles

Avant le dénombrement de *S. aureus* dans les selles, la cage de chaque lapin est bien nettoyée, pour éviter une éventuelle contamination par d'autres micro-organismes.

Le dénombrement de *S. aureus* est effectué tous les matins pendant toute la période de l'expérimentation animale (12 jours), et il est réalisé comme suit :

- Durant la période de contamination par *S. aureus* (5 jours) ;
- Durant les 7 jours de traitement avec LAB ;

4 heures après l'administration de la dose de *S. aureus* ou à la suite du traitement, les selles de lapin sont prélevées avec une spatule stérile et déposées dans une boîte de Pétri stérile, puis acheminées immédiatement au laboratoire pour procéder au dénombrement (**Figure 14**).

L'état sanitaire et le comportement des lapins et les caractéristiques des selles (aspect, consistance et volume), sont suivis durant cette étude.

## 7. Dissection

La dissection est effectuée à différentes étapes de l'expérimentation animale :

- Un lapin sain n'ayant reçu aucun traitement (témoin) est disséqué à la fin de l'expérimentation.
- Un autre lapin est disséqué dès apparition d'un état diarrhéique persistant.
- Un troisième lapin rendu diarrhéique est disséqué après sept jours de traitement avec le lait fermenté au LAB.
- Un quatrième lapin diarrhéique et n'ayant reçu que du lait écrémé stérile (lapin non traité) est également disséqué après sept jours du déclenchement de la diarrhée.

Les différentes étapes de la dissection sont rapportées comme suit :

- Après l'installation du lapin (anesthésié avec du chloroforme) sur une plaque stérile dans une hotte à flux laminaire stérile, une petite incision au niveau du ventre (de la cage thoracique à la poche urinaire) est réalisée à l'aide d'une lame de dissection stérile.
- A l'aide d'une pince stérile, la peau est soigneusement écartée.
- Des portions de l'intestin et du colon sont prélevées et mises dans 100 ml de formol à 10%

## **8. Réalisation des coupes histologiques**

### **8. 1. Préparation des lames**

Les coupes histologiques des portions intestinales et coliques des lapins disséqués, sont réalisées au niveau du laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques de Mme le Dr AMRANE (Béjaia), selon la méthode de **Hould (1984)**. Cette méthode consiste en plusieurs étapes : la circulation (déshydratation, éclaircissement, imprégnation), l'enrobage, la microtomie, l'étalement et la coloration des lames.

Les étapes de la circulation sont résumées dans le **Tableau IX**.

**Tableau IX** Etape de la circulation (déshydratation, éclaircissement et imprégnation)

<b>Etape</b>	<b>Durée</b>
<b>Déshydratation :</b> Ethanol (70%) 1er bain ; Ethanol (80%) 2ème bain ; Ethanol (90%) 3ème bain ; Ethanol (96%) 4ème bain ; Acétone un seul bain ;	 30 min 30 min 1 h 1 h 20 min
<b>Eclaircissement :</b> Xylène 1er bain ; Xylène 2ème bain ;	 30 min 1 h
<b>Imprégnation :</b> Paraffine 1er bain ; Paraffine 2ème bain ;	 30 min à 60°C 1 h à 60°C

### **8. 2. Etalement et coloration histologique**

Les segments d'intestins et de côlons sont enrobés dans des blocs de paraffine. Les coupes histologiques réalisées au microtome (4µm d'épaisseur) sont étalées sur des lames. Ces dernières subissent une coloration qui est effectuée selon les étapes décrites dans le **tableau X**.

**Tableau X** Etapes de la coloration histologique

<b>Etape</b>	<b>Durée</b>
1- Déparaffinage : Xylène	20 min à 60°C
2- Alcool (96%)	1 min
3- Réhydratation : Eau	10 min
4- Première coloration : Hématoxyline de Harris	10 min
7- Rinçage à l'eau courante	
6- Eau acidifiée (eau + 5 gouttes d'HCl)	2 immersions
7- Rinçage à l'eau courante	
8- Eau ammoniacale (eau + 5 gouttes d'ammoniac)	2 immersions
9- Rinçage à l'eau courante	
10- Deuxième coloration : Eosine	10 immersions
11- Rinçage à l'eau courante	
13- Montage des lames à l'Eukitte	

### **8. 3. Observation microscopique**

L'observation microscopique des lames préparées, est faite au microscope optique (Zeiss).

### **VI. Analyse statistique**

Le test effectué dans cette étude statistique est le test *t* de Student de comparaison des moyennes de deux échantillons appariés sous le logiciel STATISTICA 5.5 (Ed. 99). Ce teste est utilisé pour :

- La mesure de la concentration extracellulaire des ions  $K^+$
- L'étude de l'antagonisme de la souche de LAB envers les souches de *S. aureus* dans du lait écrémé
- L'étude *in vivo* de l'antagonisme de LAB envers la souche de *S. aureus* retenue

# *Résultats et discussion*

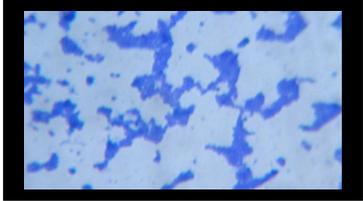
## Chapitre I. Isolement et identification des souches de *Staphylococcus aureus*

### 1. A partir des selles

Au cours de cette étude qui s'est déroulée durant la période allant de décembre 2008 à mars 2009 à l'hôpital d'Amizour de la wilaya de Béjaia, nous avons fait des prélèvements de selles sur 58 patients diarrhéiques soumis à une antibiothérapie.

L'isolement des souches de *S. aureus* à partir des échantillons de selles, est effectué sur gélose Chapman, les souches ayant donné des colonies jaune-doré, sont retenues pour des tests d'identification en se référant aux données de **Guiraud et Rosec (2004)**. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **Tableau XI**.

**Tableau XI** Résultats de l'identification des souches de *S. aureus*

Test effectué	Caractères recherchés	Résultats	Illustration
Culture sur milieu Chapman	Fermentation du mannitol	Colonies jaunes dorées entourées d'une auréole jaune (mannitol +)	
Coloration de Gram	Aspect des cellules et type de paroi	Cocci à Gram positif disposés en amas	
Test de la catalase	Présence d'une catalase	Apparition d'une effervescence	
Test de l'ADNase	Présence d'une ADNase	Après pulvérisation de HCl 1N sur la gélose à ADN, les stries apparaissent entourées de zones claires	
Test de coagulase	Présence d'une coagulase	Coagulation du plasma	

Au total, 5 souches de *S. aureus* (**8,62%**) ont été isolées et identifiées (**Tableau XII**). Les autres cas de diarrhées seraient dus à d'autres agents bactériens autres que *S. aureus*.

**Tableau XII** Répartition des souches de *S. aureus* en fonction du service hospitalier, âge, sexe et antibiotiques administrés au patient

Souche	Service hospitalier	Age	Sexe	Antibiotiques administrés au patient
S <sub>1</sub>	Chirurgie	33 ans	F	Cefacidal et gentamicine
S <sub>2</sub>	Pédiatrie	18 mois	F	Cefacidal et gentamicine
<b>S<sub>3</sub></b>	<b>Pédiatrie</b>	<b>8 mois</b>	<b>H</b>	<b>Amoxilline</b>
S <sub>4</sub>	Médecine interne	83 ans	H	Cefacidal
S <sub>5</sub>	Médecine interne	68 ans	H	Ampicilline

S : souche de *S. aureus* isolée des selles, F : femme, H : homme

En effet, les diarrhées associées aux antibiotiques (DAA), dont l'incidence varie dans la population générale de 5 à 25 % en fonction de l'antibiotique prescrit (**Bartlett, 2002**), sont le plus souvent liées à un déséquilibre de la flore intestinale, qui altère profondément la flore dominante, en particulier par le fait de l'émergence de souches pathogènes comme *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. ou *Escherichia coli* (**Kaltenbach et Heitz 2004**).

Une étude menée par **Baba-Moussa et al. (2010)** sur 115 patients diarrhéiques sous antibiothérapie, hospitalisés en Afrique, a montré que sur les 230 prélèvements de selles, 13,91% (43/230) des diarrhées sont dus à *S. aureus*, 18,7% (43/230) à *Salmonella*, 13,5% (31/230) à *Vibrio cholerae*, 4,3% (10/230) à *Shigella*, 35,21 % (81/230) à *Escherichia coli*, 8,7% (20/230) à *Clostridium difficile* et 5,6% (13/230) à d'autres bactéries Gram négatif.

**Flemming et Ackermann (2007)** ont rapporté dans une étude basée sur les diarrhées nosocomiales causées par *S. aureus*, que sur 2727 échantillons de selles prélevés à partir de patients sous antibiothérapie, 198 (7,3%) et 148 (5,42%) souches respectivement de *S. aureus* et de *Clostridium difficile* ont été isolées.

## **1.1. Données répertoriées**

- **Age des patients**

Parmi les 58 patients, **36,2%** étaient âgés de plus de 65ans, **43,1%** de moins de 6ans et **20,7%** entre 6 et 65ans.

L'âge est un facteur de risque significatif de DAA, puisque leur fréquence est plus élevée chez les enfants de moins de six ans et chez les personnes âgées de plus de 65 ans (**Kaltenbach et Heitz 2004**).

Ces diarrhées sont particulièrement fréquentes chez les personnes âgées polypathologiques, car l'âge et la sévérité des maladies chroniques associées sont des facteurs de risque démontrés (**McFarland, 1995**).

Toute diarrhée, même apparemment banale, peut entraîner chez une personne âgée, fragile une déshydratation ou aggraver une dénutrition, et contribuer à déstabiliser une situation précaire (**Slotwiner-Nie et Brandt, 2001**).

Cependant le taux de diarrhée le plus élevé reste chez les enfants de moins de 6ans avec 43,1%. En effet, la fragilité et la sensibilité du jeune enfant font de lui une cible favorable pour divers agents microbiens. Dès la première colonisation, des micro-organismes pathogènes nuisibles peuvent peupler les différentes muqueuses et engendrer diverses pathologies telles que les infections respiratoires, méningites et les infections gastro-intestinales accompagnées de diarrhée (**Delmee, 2003**).

Divers facteurs peuvent aussi favoriser l'implantation de micro-organismes pathogènes responsables de diarrhées, telle qu'une antibiothérapie non adaptée, une malnutrition ou une alimentation non équilibrée, un manque d'hygiène ou un allaitement artificiel non adéquat. Effectivement, l'augmentation du nombre de cas diarrhéiques à cette tranche d'âge peut être associée à la baisse de l'allaitement maternel, car à 5 mois les nourrissons commencent à développer progressivement leur système immunitaire pendant qu'il se produit une baisse des anticorps d'origine maternelle, ce qui rend les nourrissons vulnérables aux infections (**Diouf et al., 1990**).

Dans les pays en voie de développement avec un taux de morbidité modéré ou élevé, les nourrissons allaités au lait artificiel ont des risques de mourir de diarrhée ou de pneumonie respectivement de 4 à 14 fois plus élevés que ceux recevant du lait maternel (**OMS, 2000**).

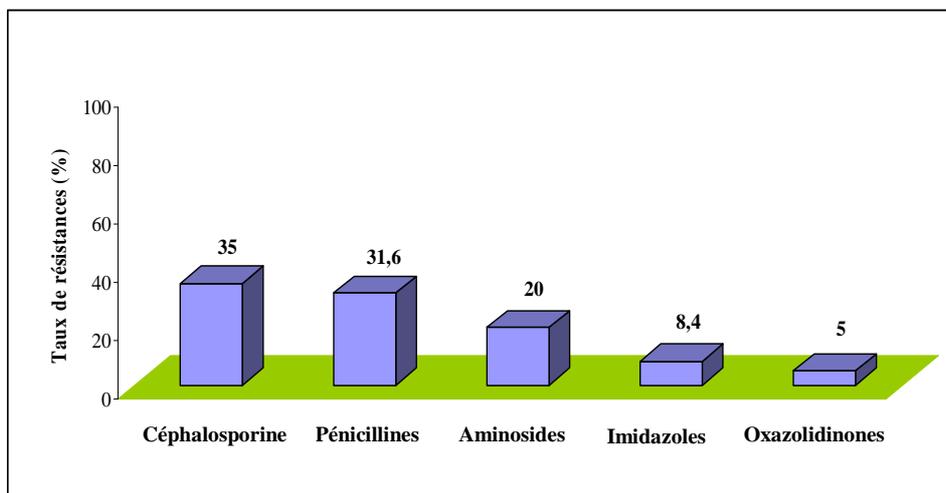
Plus de 20% des enfants souffrant de désordres intestinaux développent des diarrhées persistantes qui sont associées à une augmentation du risque de mortalité (**Boclé, 2005**).

La diarrhée représente en Algérie et de part le Monde l'une des causes principales de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans (5 à 10 millions de morts par an dans les pays en voie de développement) (OMS, 2006).

Selon l'estimation de l'OMS, 3,2 millions de décès assignables à la diarrhée surviennent aux cours des deux premières années de la vie, principalement après déshydratation. En Algérie, en 1999, 21692 enfants de moins de cinq ans ont été hospitalisés pour diarrhée, dont 1374 décéderont par déshydratation (Simeoni, 2000).

- **Antibiotiques administrés aux patients**

Les différentes classes d'antibiotiques administrées aux patients étaient réparties comme suit: les céphalosporines (35%), pénicillines (31,6%), aminosides (20%), imidazoles (8,4%) et oxazolidinones (5%) (Figure 15).



**Figure 15** Taux d'antibiotiques administrés aux patients par classe

Les classes d'antibiotiques les plus administrées aux patients diarrhéiques, sont la céphalosporine et la pénicilline.

En effet, l'incidence des DAA varie en fonction de l'antibiotique prescrit : 5 à 10 % pour l'ampicilline, 10 à 25 % pour l'association amoxicilline–acide clavulanique, 15 à 20 % pour les céphalosporines de troisième génération, 2 à 5 % pour les fluoroquinolones, les macrolides et les tétracyclines (Bartlett, 2002).

Actuellement, les DAA sont le plus souvent consécutives à la prescription de bêta-lactamines, mais elles peuvent survenir après la prescription de presque tous les antibiotiques (Mylonakis *et al.*, 2001).

La dose totale et la voie d'administration n'ont pas d'influence significative sur la fréquence des DAA, mais le nombre d'antibiotiques prescrits et la durée de l'antibiothérapie augmentent nettement le risque de survenue de DAA (**McFarland, 1998**).

Les diarrhées à *S. aureus* surviennent essentiellement après la prescription de fluoroquinolones, associées ou non à d'autres molécules anti-infectieuses. Elles entraînent un déséquilibre de la flore digestive et permettent la sélection de *S. aureus* méthicilline-résistants, retrouvés dans la majorité des DAA à *S. aureus* (**Kaltenbach et Heitz 2004**).

**Flemming et Ackermann (2007)** ont trouvé, que sur 71 patients diarrhéiques avec des échantillons de selles positifs à *S. aureus*, 25,3% recevaient des fluoroquinolones, 23,9% des céphalosporines et 18,3% des pénicillines.

L'étude réalisée par **Baba-Moussa et al. (2010)**, a montré que sur 21 patients atteints de diarrhée à *S. aureus*, 7 ont été traités avec l'ampicilline, 10 avec l'amoxicilline, 3 avec la gentamicine et un seul recevait de la céfuroxime. Chez ces patients, la diarrhée a souvent disparu lorsque le traitement anti-staphylococcique approprié a été administré, comme la vancomycine, ou à l'arrêt de l'antibiothérapie qui a permis la reconstitution de la flore digestive.

La prévention des DAA repose essentiellement sur l'indication justifiée d'une antibiothérapie, sur le choix de l'antibiotique et sur des mesures d'isolement des malades infectés pour limiter la transmission exogène de la bactérie par manuportage (**Kaltenbach et Heitz, 2004**).

Effectivement, plusieurs publications documentent le fait que les antibiotiques sont souvent prescrits de façon inadéquate ou pour une durée trop longue. Une sur-utilisation des antibiotiques dans les hôpitaux, expose les patients à des effets secondaires potentiels, favorise le développement des infections comme les DAA, et favorise l'émergence de bactéries résistantes nécessitant l'utilisation d'antibiotiques plus puissants, plus coûteux et souvent plus toxiques (**CINQ, 2005**).

## **2. A partir de lait de vaches mammitesuses**

L'isolement des souches de *Staphylococcus aureus* a été effectué durant la période mars à Mai 2009, à partir de lait de 17 vaches mammitesuses de la région d'Amizour, après que ces dernières eurent été traitées avec des antibiotiques. Parmi elles, 3 ont été atteintes de mammites cliniques (**17,64%**) et les 14 autres de mammites subcliniques (**82,35%**).

95% des cas de mammites sont subcliniques, lorsque les bovins sont atteints de mammites subcliniques, des changements macroscopiques des mamelles ne sont pas observés, il se produit des changements dans la composition et la quantité de lait produit (**Fox et al., 2001**).

Une étude réalisée à Rio de Janeiro sur les mammites bovines causées par *Staphylococcus aureus*, a montré que les 98 échantillons de lait collectés sont tous issus de vaches atteintes de mammites subcliniques (**Coelho et al., 2009**).

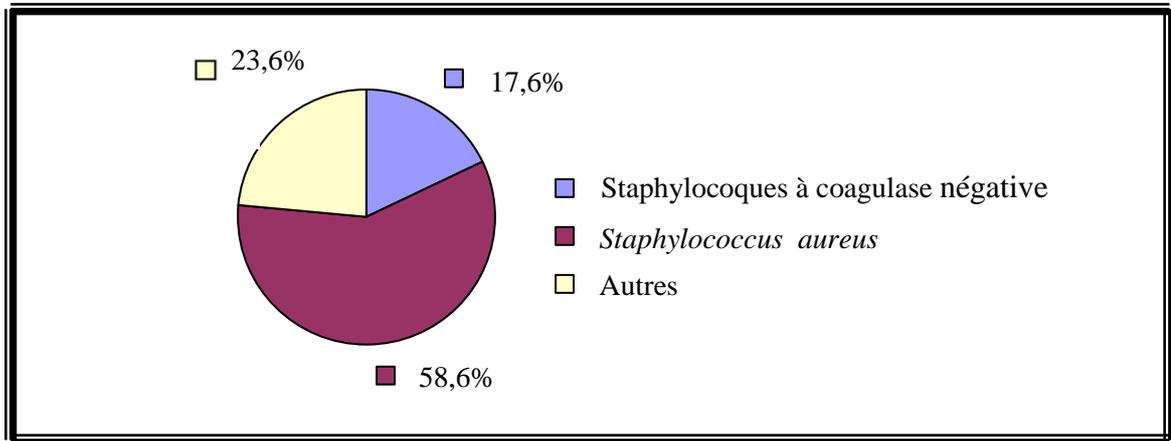
Une enquête menée à Jijel a permis de déceler par le test de CMT (California Mastitis Test), la présence de mammite chez 80% des vaches dans 15 exploitations, 95% de ces mammites étaient subcliniques (**Rahal et al., 2009**).

Les souches de staphylocoques isolées à partir des échantillons de lait ayant donné une coloration noire du milieu de Giolitti Cantoni, sont purifiées sur gélose Chapman et les souches fermentant le mannitol et formant des colonies jaune-doré sont retenues pour des tests d'identification (**Tableau XI**).

4 échantillons de lait ne contenaient pas de staphylocoques, on en a conclu que ces mammites étaient dues à des agents microbiens autres que des staphylocoques.

Les tests d'identification ont permis de confirmer l'appartenance de 10 souches (L<sub>1</sub> à L<sub>10</sub>) à l'espèce *Staphylococcus aureus*, elles étaient toutes isolées à partir de vaches atteintes de mammites subcliniques qui recevaient un traitement intra-mammaire (Amoxicilline plus acide clavulanique).

Sur 17 échantillons de lait de vaches mammitesuses, 58,8% sont dues à *S. aureus*, 23,6% de ces mammites n'étaient pas dues à des staphylocoques, 17,6% étaient dues à des staphylocoques à coagulase négative et (Figure 16).



**Figure 16** Fréquence d'isolement des bactéries à l'origine de mammites

Selon **Deverriere (2007)**, dans les Pyrénées-Atlantiques et le rayon de Roquefort, les cas sporadiques de mammites cliniques bovines sont principalement dus à *Staphylococcus aureus*. En seconde position, on note l'importance des staphylocoques à coagulase négative, puis, par ordre de prévalence décroissant, viennent les streptocoques, les *Pasteurellaceae*, les entérobactéries, *Arcanobacterium pyogenes*, les corynebactéries, , *Pseudomonas spp.* etc.

Une étude réalisée à Alger, qui a porté sur 69 vaches laitières appartenant à 22 élevages distincts, a permis d'aboutir aux résultats suivants : les analyses bactériologiques des échantillons de lait ont montré la présence de coques à Gram positif, notamment des staphylocoques à coagulase positive (7%), des staphylocoques à coagulase négative (1%) et des streptocoques (7%) (**Boulbina et al., 2009**).

Les mêmes observations ont été faites par **Keramane (2009)**, sur 19 échantillons de lait de vaches mammitesuses (récoltés dans la région de Béjaïa), 26,31% de ces mammites n'étaient pas dues à des staphylocoques, 21,05% étaient dues à des staphylocoques à coagulase négative et 52,64% à *S. aureus*.

Concernant l'épidémiologie analytique des mammites à *S. aureus*, le réservoir principal de staphylocoques est constitué par les infections subcliniques et cutanées des trayons (traumatisme, surinfection suite de l'eczéma contagieux). Les sources accessoires de Staphylocoques sont, le

lieu de couchage, l'aliment, l'air, les insectes, les équipements, les mains de l'éleveur et les autres animaux. Au contraire, les entérobactéries et entérocoques se trouvent surtout dans la litière (**Deverriere, 2007**).

En plus de l'implication des mammites dans les pertes financières, il ne faut pas négliger leur incidence en santé publique. L'utilisation intensive des antibiotiques pour le traitement et la prévention des mammites constitue une menace pour la santé humaine par l'émergence de souches antibio-résistantes qui, par le biais du lait sont introduites dans la chaîne alimentaire (**Werckenthin et al., 2001**).

**Chapitre II. Antibiogrammes des souches de *S. aureus* identifiées**

Pour pouvoir sélectionner les souches de *S. aureus* multirésistantes à partir de selles et de lait de vaches mammitesuses, des antibiogrammes de ces dernières ont été effectués

**1. Souches isolées des selles**

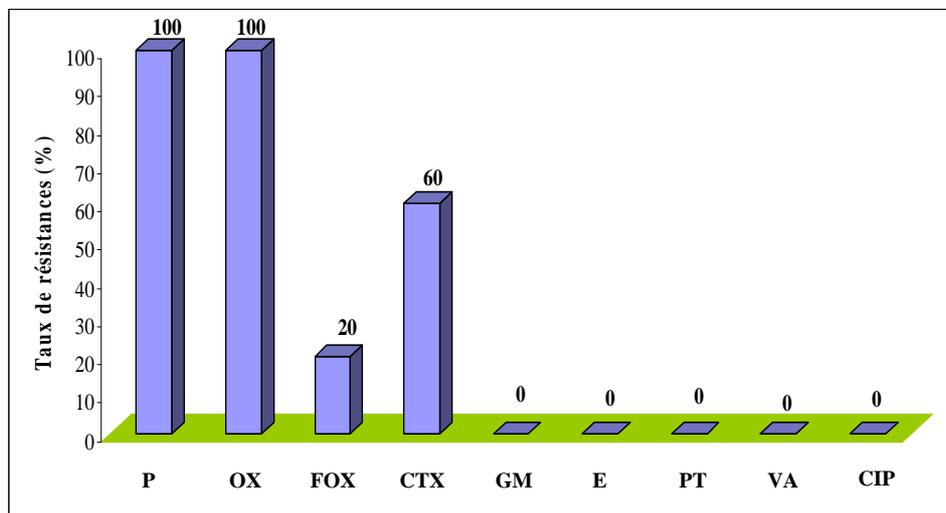
Les résultats des antibiogrammes des souches de *Staphylococcus aureus* isolées des selles sont représentés dans le **Tableau XIII**

**Tableau XIII** Antibiogrammes des souches de *S. aureus* isolées des selles

Souches de <i>S. aureus</i>	Antibiotiques								
	P	OX	FOX	CTX	GM	E	PT	VA	CIP
S <sub>1</sub>	R	R	S	R	S	S	S	S	S
S <sub>2</sub>	R	R	S	R	S	S	S	S	S
S <sub>3</sub>	R	R	R	R	S	S	S	S	S
S <sub>4</sub>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
S <sub>5</sub>	R	R	S	S	S	S	S	S	S

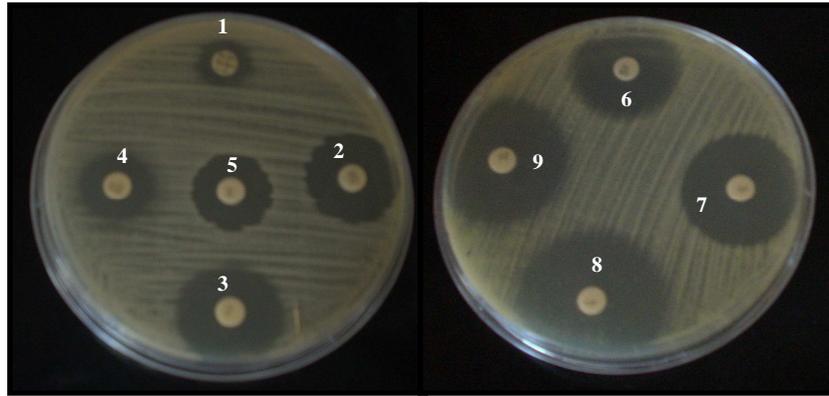
S: sensible, R: résistant

Les résultats obtenus indiquent que sur 5 souches de *S. aureus* isolées, **100%** sont résistantes à la pénicilline G et à l’oxacilline, **60%** à la céfotaxime, **20%** à la céfoxitine, aucune résistance n’a été détectée pour la gentamicine, erythromycine, pristnamycine, vancomycine et ciprofloxacine (**Figure 17**).



**Figure 17** Taux de résistance des souches de *S. aureus* (isolées des selles) aux différents antibiotiques testés

Toutes les souches de *S. aureus* isolées sont sensibles à la céfoxitine à l’exception de la souche (**S<sub>3</sub>**) qui y est résistante et qui est par la même résistante à la méthicilline et à toutes les bêtalactamines (**Figure 18**).



**Figure 18** Antibiogrammes de *S. aureus* (S<sub>3</sub>)

(1 : OX, 2 : FOX, 3 : P, 4 : CTX, 5 : VA, 6 : CIP, 7 : E, 8 : PT, 9 : GM)

Les résultats montrent que les souches isolées ont développé des résistances aux bêta-lactamines (oxacilline, céfotaxime et céfoxitine) mais pas aux aminosides, macrolides, streptogramines, glycopeptides et fluroquinolones.

Ce qui est en accord avec les observations faites par **Baba-Moussa *et al.* (2010)** qui ont trouvé que sur 21 souches de *S. aureus* isolées des selles de patients diarrhéiques post antibiothérapie, 100% étaient résistantes à la pénicilline G, 95% à l'oxacilline et seulement 2% étaient résistantes à la pristinaamycine et 6% à la gentamicine. Aucune résistance n'a été rapportée pour la vancomycine.

En effet, *S. aureus* a développé différents mécanismes de résistance aux antibiotiques, en particulier aux bêta-lactamines. Cette résistance des souches de *S. aureus* aux bêta-lactamines est due principalement à deux facteurs, la synthèse de bêta-lactamases et la présence du gène *mecA* qui code pour une protéine de liaison aux pénicillines (PLP2a) de faible affinité aux bêta-lactamines, conférant ainsi une résistance à toutes les bêta-lactamines (**Batard *et al.*, 2005**).

Actuellement, 80 à 95 % des souches de *S. aureus* hospitalières produisent une pénicillinase qui inactive la plupart des pénicillines, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*. Effectivement, si une résistance à la pénicilline G est détectée, les bêta-lactamines suivantes seront inactives : pénicilline G, ampicilline, amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline. En revanche, l'association à des inhibiteurs de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) restaure une sensibilité à ces antibiotiques. Les céphalosporines et l'imipénème ne sont pas hydrolysés par la pénicillinase (**Daurel et Leclercq, 2008**).

**Lindberg et al. (2009)** ont isolé 116 souches de *S. aureus* à partir de selles d'enfants, pour lesquelles ils ont recherché l'antibiorésistance, ils ont constaté que, 78% présentent une résistance à la pénicilline G, 3% à l'érythromycine A, 2% à la tétracycline, 0,9% à la clindamycine et aucune résistance pour la méticilline.

De nombreuses souches de *S. aureus* hospitalières et plus récemment communautaires ont développé une résistance croisée entre l'oxacilline et les autres bêta-lactamines par production d'une protéine (PLP2a). Cette dernière résistance est plus facilement décelée par le test de la céfoxitine (**Daurel et Leclercq, 2008**). C'est le cas de la souche (**S<sub>3</sub>**) qui est un SARM isolé à partir des selles d'un nourrisson diarrhéique de 8mois admis au service de pédiatrie.

Cependant, le diagnostic de certitude de la méticillino-résistance repose sur la détection du gène *mecA* par PCR (**Daurel et Leclercq, 2008**).

**Efuntoye et Adetosoye (2003)**, ont trouvé 5 SARM (7%) sur 72 souches de *S. aureus* isolées à partir de selles d'enfants diarrhéiques de moins de cinq ans.

*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline est le premier agent pathogène responsable d'infections nosocomiales et post-opératoires. Il est devenu endémique dans certains secteurs de l'hôpital, comme les centres de rééducation, les services de long séjour et les services de réanimation (30% des infections nosocomiales), des souches hypervirulentes de *S. aureus* responsables de chocs toxiques et de pneumonies nécrosantes gravissimes ont émergé, entraînant un taux de mortalité élevé. Les SARM sont devenus endémiques en milieu hospitalier mais des SARM d'origine communautaire sont de plus en plus fréquemment rapportés (**Corne, 2004**).

## 2. Souches isolées du lait mammitiqueux

Les résultats des antibiogrammes des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de lait mammitiqueux sont représentés dans le **Tableau XIV**

**Tableau XIV** Antibiogrammes des souches de *S. aureus* isolées de lait mammitiqueux

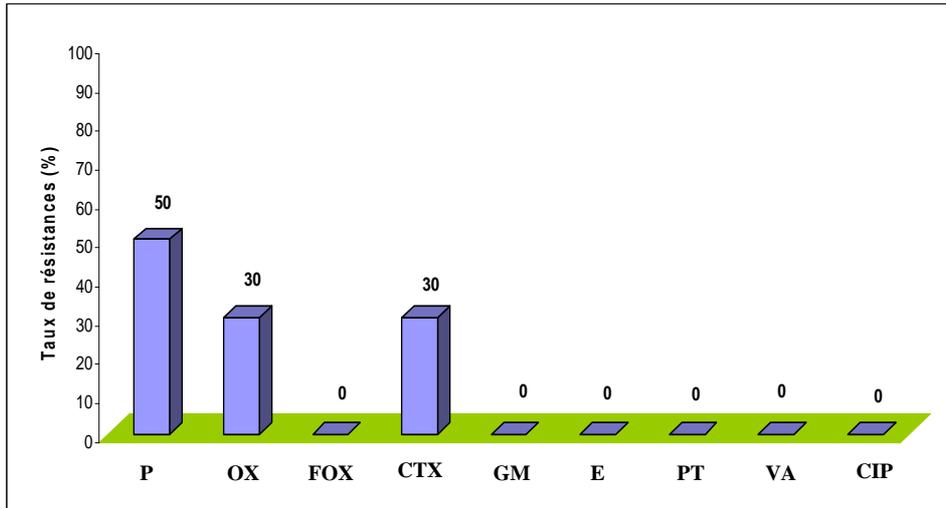
Souches de <i>S. aureus</i>	Antibiotiques								
	P	OX	FOX	CTX	GM	E	PT	VA	CIP
L <sub>1</sub>	R	S	S	S	S	S	S	S	S
L <sub>2</sub>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L <sub>3</sub>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L <sub>4</sub>	R	S	S	R	S	S	S	S	S
L <sub>5</sub>	R	R	I	R	S	S	S	S	S
L <sub>6</sub>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
L <sub>7</sub>	R	R	S	R	S	S	S	S	S
L <sub>8</sub>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L <sub>9</sub>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L <sub>10</sub>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S : sensible I: intermédiaire R : résistant

Les résultats obtenus indiquent que sur 10 souches de *S. aureus* isolées, **50%** sont sensibles à tous les antibiotiques testés. Par contre, **50%** sont résistantes à la pénicilline G, **30%** à l'oxacilline et **30%** à la céfotaxime. Aucune résistance n'a été détectée pour la céfoxitine, gentamicine, erythromycine, pristinamycine, vancomycine et ciprofloxacine (**Figure 19**).

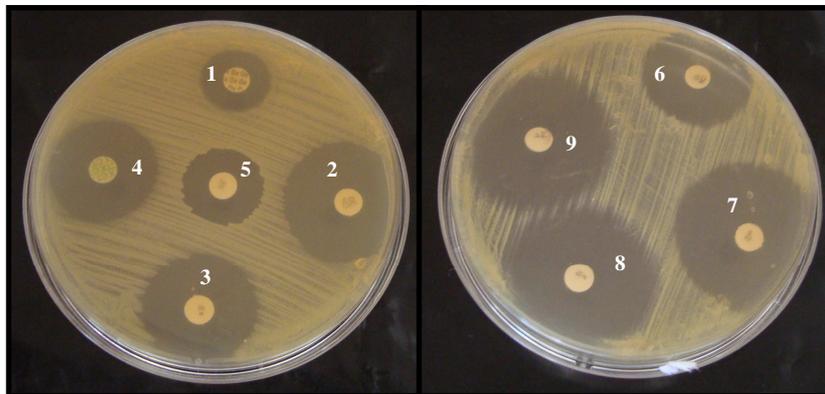
Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par **Coelho et al. (2009)** qui ont trouvé que sur 21 souches de *S. aureus* isolées de lait de vaches atteintes de mammites subcliniques, 42% présentaient une sensibilité vis-à-vis de tous les antibiotiques testés, par contre 47% étaient résistantes à la pénicilline, 25% à l'oxacilline et 43% à l'ampicilline.

**Boulbina et al. (2009)** ont isolé 10 souches de *S. aureus* à partir de lait de 69 vaches atteintes de mammites appartenant à 22 élevages distincts en Algérie, l'étude de l'antibiorésistance des 10 souches vis-à-vis des antibiotiques, a montré l'existence de 6 antibiotiques pour lesquels aucune résistance n'a été observée (érythromycine, spiramycine, enrofloxacin, triméthoprime/sulfaméthoxazole, néomycine et la rifampicine). En revanche, des résistances ont été observées par rapport aux autres antibiotiques (la pénicilline, l'oxacilline, l'amoxicilline, l'ampicilline, la ceftiofur, la bacitracine et la tétracycline).



**Figure 19** Taux de résistance des souches de *S. aureus* isolées de lait mammitique aux différents antibiotiques testés

La souche (L<sub>5</sub>) est celle qui présente le plus de multirésistance, elle est résistante à la pénicilline, oxacilline, céfotaxime et elle présente un diamètre intermédiaire vis-à-vis de la céfoxitine (**Figure 20**).



**Figure 20** Antibiogrammes de *S. aureus* (L<sub>5</sub>)

(1 : OX, 2 : FOX, 3 : P, 4 : CTX, 5 : VA, 6 : CIP, 7 : E, 8 : PT, 9 : GM)

Dans une étude rapportée par **Nickerson (2008)**, 45 quartiers de mamelles de chèvres traitées aux antibiotiques, contenaient *Staphylococcus aureus* pendant leur traitement. Il a rapporté que même avec un traitement et une voie d'administration optimale, seulement 90,9% des infections intra-mammaires disparaissaient complètement pour les chèvres et chez les vaches le taux était inférieur, il reste donc toujours une large proportion de bactéries non éliminée, cette persistance peut être due à la sélection de souches résistantes aux antibiotiques, elle peut

également être due à la non accessibilité des antibiotiques à la zone d'infection en quantité efficace (**Gruet et al., 2001**), ou encore à la formation de biofilms par les souches de *S. aureus*, ce qui les rend moins sensibles aux antibiotiques (**Melchior et al., 2006**).

Les bêtalactamines sont très largement utilisées pour le traitement des mammites bovines, ce qui a conduit à l'apparition de résistance chez les souches de *S. aureus* responsables des mammites. La production de bêtalactamases est très courante chez les souches de *S. aureus* d'origine humaine tandis que la recherche de leur production chez les souches d'origine vétérinaire n'est pas courante (**André et al., 2008**). Dans l'étude de **Kaszanyitzky-Juhász (2007)**, 96% et 55% de souches de *S. aureus* isolées respectivement de patients humains et de mammites étaient bêtalactamase positive.

L'évaluation de la résistance aux antibiotiques des agents de mammites constitue donc un outil important pour le contrôle des mammites et devrait être effectué dans toutes les exploitations laitières.

Le nombre d'infections à *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez les animaux est surprenant, donnant un rôle considérable à *S. aureus* comme agent pathogène pour les bovins et les humains. **Reinoso et al. (2008)** ont rapporté dans une étude basée sur la caractérisation génotypique de souches de *S. aureus* isolées d'origines différentes : Homme, mammites bovines et aliments d'origine animale, que les résistances provenant de mammites sub-cliniques pouvaient constituer une zoonose et donc une menace pour l'Homme.

**Weese et Duijkeren (2009)**, en s'appuyant sur des études ayant identifié 0,2 à 0,5 % de souches SARM présentes dans le lait cru et dans deux sortes de fromages, confirment que la présence des SARM dans les produits alimentaires a une incidence directe sur la santé humaine.

Les deux souches (**S<sub>3</sub>**) et (**L<sub>5</sub>**) isolées respectivement des selles et du lait mammitique, ont été retenues pour l'étude de l'antagonisme *in vitro* avec les souches de bactéries lactiques.

### Chapitre III. Mise en évidence de l'activité antibactérienne *in vitro* de souches de bactéries lactiques à l'égard des souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques

#### 1. Test des spots

Six souches de bactéries lactiques ont été criblées à l'égard des deux souches de *S. aureus* ( $S_3$ ) et ( $L_5$ ) (Tableau XV).

Tableau XV Résultats du test des spots

Souches tests	Diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches cibles	
	<i>S. aureus</i> ( $S_3$ )	<i>S. aureus</i> ( $L_5$ )
<i>Lb. paracasei</i>	20	18
<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	13	11
<i>Enterococcus faecalis</i> (2)	15	11
<i>Enterococcus</i> sp.	15	12
<i>Lc. lactis</i> (1)	15	11
<i>Lc. lactis</i> (2)	13	11

Toutes les souches tests utilisées pour l'antagonisme direct, ont donné des zones d'inhibition à l'égard des deux souches cibles ( $S_3$ ) et ( $L_5$ ). Cependant, la souche ( $L_5$ ) semble présenter des diamètres de zones d'inhibition plus réduits que ceux de la souche ( $S_3$ ).

*Lb. paracasei* témoigne de la meilleure activité antibactérienne envers les deux souches de *S. aureus* ( $S_3$ ) et ( $L_5$ ), avec respectivement des diamètres de zones d'inhibition de 20 et 18mm (Figure 21), elle sera donc retenue pour la suite de l'étude.

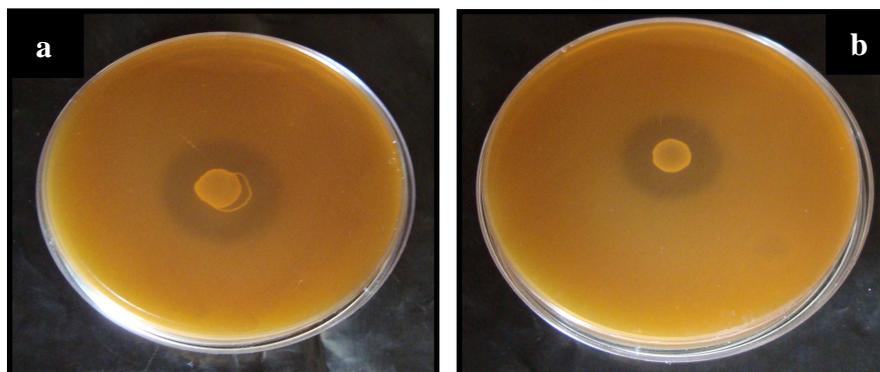


Figure 21 Test des spots, a : *Lb. paracasei* à l'égard de *S. aureus* ( $S_3$ ) avec une zone d'inhibition de 20 mm, b : *Lb. paracasei* à l'égard de *S. aureus* ( $L_5$ ) avec une zone d'inhibition de 18 mm

L'antagonisme des bactéries lactiques envers les souches de *S. aureus* est dû probablement, à la synthèse de plusieurs composés antimicrobiens, à savoir : des acides organiques (lactique, acétique, formique, phényl-lactique), le dioxyde de carbone, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, l'éthanol ou encore des composés protéiques assimilables aux bactériocines (**Messens et De Vuyst, 2002**).

**Anas et al. (2009)** ont étudié l'activité antibactérienne de 8 espèces de *Lactobacillus* à l'égard de *S. aureus* par le test des spots, ils ont trouvé que *Lactobacillus plantarum* est la souche test qui a témoigné du meilleur effet antagoniste. Ils ont attribué cet effet inhibiteur à deux facteurs ; la production d'acide lactique et de bactériocines.

Une étude qui a porté sur la sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes, a montré que sur les 20 souches isolées, 3 d'entre elles appartenant aux genres *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* présentaient une bonne activité antibactérienne à l'égard de *S. aureus* ATCC 27853 par la méthode de diffusion en milieu gélosé, avec des diamètres de zones d'inhibition respectivement de (32,5), (28,2) et (23,3mm). Ce pouvoir antibactérien est attribué aux bactériocines après que l'hypothèse de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène soit écartée, car la neutralisation du surnageant et l'ajout de catalase n'entraînent pas de diminution du diamètre d'inhibition (**Labioui et al., 2005**).

**Karska-Wysocki et al. (2009)** ont étudié l'effet antagoniste de *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* envers un SARM (ATTC 43300) par le test des spots en milieu gélosé. Les résultats obtenus montrent que: les souches de *Lb. acidophilus* et *Lb. casei* révèlent des zones d'inhibition avec des diamètres respectivement de 27,7 et 23mm, par contre la souche de *Lc. Lactis* ssp *cremoris* n'a montré aucune activité à l'égard de *S. aureus*.

L'inhibition de *S. aureus* par la production de peroxyde d'hydrogène chez les souches de *Lactobacillus* est bien connue, certaines sont capables de provoquer un effet bactériostatique sur les souches de *S. aureus* (bien que catalase positive) avec une concentration de 0,18 mmol/l et un effet bactéricide avec une concentration allant de 0,6 à 1 mmol/l (**Charlier et al., 2008**).

**Ito et al. (2003)** ont étudié le potentiel de *Lc. lactis* à inhiber les micro-organismes pathogènes et d'altération par la production de peroxyde d'hydrogène, ils ont montré qu'une quantité de 350ppm de peroxyde d'hydrogène produite par des souches de *Lc. lactis* avait une action antibactérienne efficace contre *S. aureus*.

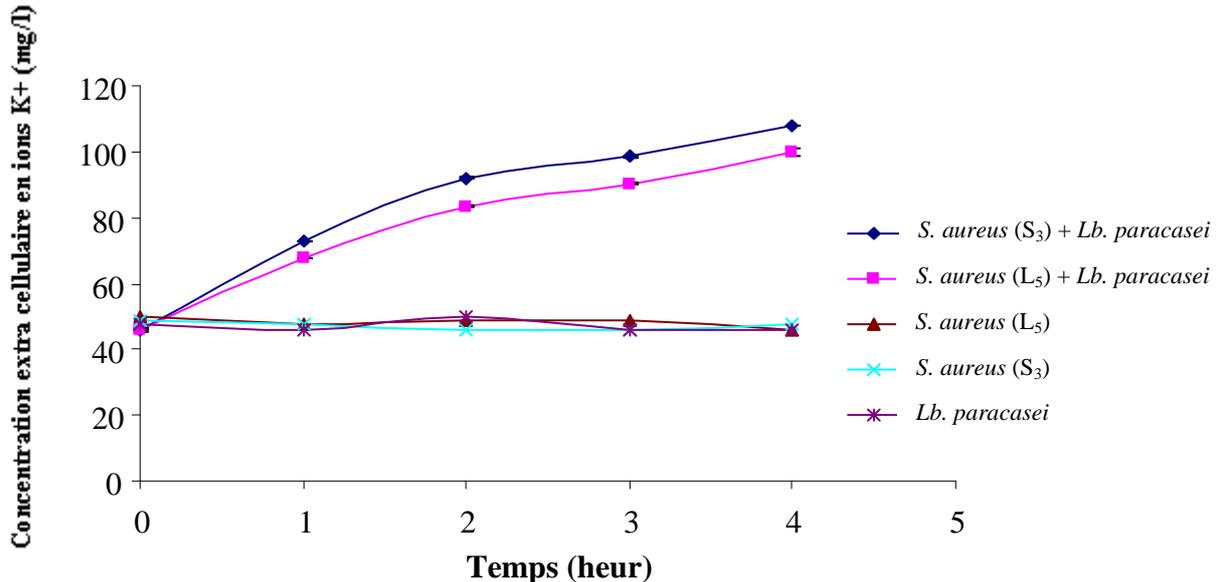
## 2. Mesure de la concentration extracellulaire des ions $K^+$

Pour savoir si *Lb. paracasei* a un impact sur la perméabilisation de la membrane de *S. aureus* exprimé par la fuite des ions  $K^+$ , la concentration externe de ces derniers est mesurée dans les surnageants des cultures pures et mixtes en bouillon BHI (**Figure 22**).

Au bout de 4h d'incubation, la concentration des ions  $K^+$  dans les surnageants des cultures pures (*S. aureus* ( $L_5$ ), *S. aureus* ( $S_3$ ), *Lb. paracasei*), est restée la même, avec des valeurs proches de 46 mg/l. Cette concentration en ions  $K^+$ , mesurée dans les cultures pures, est probablement celle du milieu BHI.

Par contre, pour les cultures mixtes de *Lb. paracasei* avec respectivement chacune des deux souches de *S. aureus* ( $S_3$ ) et ( $L_5$ ), la concentration en ions  $K^+$  des surnageants, est respectivement de 108 mg/l et 100 mg/l. mais les valeurs réelles de la fuite du potassium sont de 62 mg/l et 54 mg/l (la concentration des ions  $K^+$  dans les surnageants des cultures mixtes moins celle des cultures pures).

La souche ( $S_3$ ) présente une plus grande fuite du contenu cytoplasmique en ions  $K^+$  que la souche ( $L_5$ ) en présence de *Lb. paracasei* avec une différence significative après 4 heures d'incubation [ $P_{obs} < P_{0,001}$ ] (**Tableau IV, Annexe 2**).



**Figure 22** Mesure de la concentration des ions  $K^+$  des surnageants des cultures (*S. aureus* ( $L_5$ ), *S. aureus* ( $S_3$ ), *Lb. paracasei*, *S. aureus* ( $L_5$ ) + *Lb. paracasei*, *S. aureus* ( $S_3$ ) + *Lb. paracasei*) en fonction du temps

La perméabilisation de la membrane de *S. aureus* exprimé par la fuite des ions  $K^+$  en présence de *Lb. paracasei*, peut s'expliquer par la production par *Lb. paracasei* de métabolites

qui auraient un effet anti-staphylococcique, ces substances pouvant être assimilées à des bactériocines.

En effet, Il est généralement admis que les bactériocines agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en s'y insérant et en s'y regroupant, causant ainsi la formation de pores et donc une fuite d'ions  $K^+$ , d'ATP et d'autres métabolites (Deegan *et al.*, 2006). Par conséquent, la force protonmotrice (PMF) des cellules sensibles diminue ou s'épuise (Montville et Chen, 1998)

Bendali *et al.* (2008) ont détecté une concentration d'ions  $K^+$  de 33 mg/l dans le surnageant de culture (en bouillon BHI) de *Listeria monocytogenes* traité par la bactériocine de la même souche de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* après 4 heures d'incubation.

Hobbs *et al.* 2008 ont comparé l'effet de 3 antibiotiques (daptomycine, tétracycline et moxifloxacine) et de la nisine sur la perméabilisation de la membrane de *S. aureus* 8325-4, ils ont constaté que la nisine est la molécule qui avait le plus grand impact sur la viabilité des cellules de *S. aureus* et ils ont enregistré une grande fuite du contenu cytoplasmique en ions ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ) et ATP, après seulement 10 minutes de contact (nisine plus *S. aureus*).

### 3. Etude de l'antagonisme de *Lb. paracasei* envers *S. aureus* (S<sub>3</sub> et L<sub>5</sub>) dans du lait écrémé

L'étude de l'antagonisme, *in vitro*, de *Lb. paracasei* à l'égard des souches de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>), est effectuée en cultures mixtes dans du lait écrémé. Des cultures pures (témoins) sont également réalisées (Figure 23 et 25).

Les dénombrements et la mesure du pH (Figure 24 et 26) ont été effectués toutes les deux heures pendant 24 h.

Les résultats rapportés dans les figures 23 et 25 montrent que les souches de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) en culture pure présentent une courbe de croissance normale, abordant la phase exponentielle dès le début de la culture. Une augmentation des taux cellulaires des deux souches (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) ainsi qu'une diminution de leur pH à des valeurs respectivement de  $4,5 \cdot 10^8$  UFC/ml, pH 6,09 et  $7,9 \cdot 10^8$  UFC/ml, pH 5,65 après 24 h d'incubation sont enregistrées (Tableau IX et X, Annexe 2). Tandis qu'en cultures mixtes, la croissance des deux souches (S<sub>3</sub> et L<sub>5</sub>) en présence de *Lb. paracasei* suit deux allures différentes :

• *Lb. paracasei* en culture mixte avec *S. aureus* (L<sub>5</sub>)

On remarque qu'il n'y a pas de diminution de la croissance de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) son taux augmente à  $4.10^7$  UFC/ml après 4 heures de culture, cependant le nombre de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) est nettement inférieur au témoin à partir de la 6<sup>ème</sup> heure de culture avec une différence significative [ $P_{0,05} > P_{obs} > P_{0,01}$ ] (Tableau V, Annex 2), par la suite le nombre de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) reste stable à  $10^7$  UFC/ml durant les 24 h de culture. On suppose que *Lb. paracasei* induit une phase stationnaire précoce chez *S. aureus* (L<sub>5</sub>). Quant au pH de la culture mixte (pH 4,9), il est plus bas que celui du témoin (pH 5,65) après 24 heures de culture.

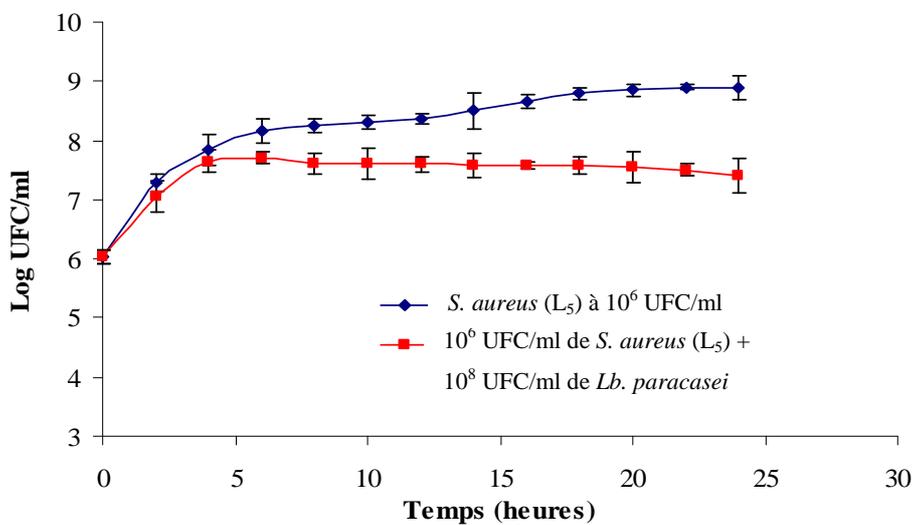


Figure 23 Cinétique de croissance de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) en culture mixte avec *Lb. paracasei* et en culture pure, dans le lait écrémé

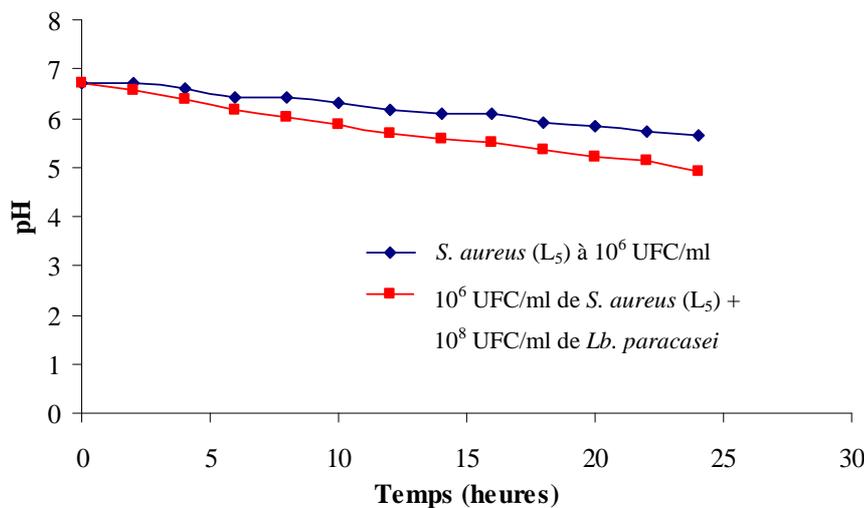


Figure 24 Evolution du pH de la culture mixte de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) avec *Lb. paracasei* et de la culture pure de *S. aureus* (L<sub>5</sub>), dans le lait écrémé

• *Lb. paracasei* en culture mixte avec *S. aureus* (S<sub>3</sub>)

Pendant les 4 premières heures de culture, aucune différence significative n'a été enregistrée entre la culture mixte et témoin de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) [ $P_{obs} > P_{0,05}$ ] (Tableau VI, Annexe 2), le nombre de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) est resté stable entre 6 h et 20 h à une valeur de  $10^7$  UFC/ml, cependant il a été nettement inférieur au témoin avec une différence hautement significative [ $P_{0,01} > P_{obs} > P_{0,001}$ ], pour ensuite diminuer jusqu'à atteindre un nombre de  $4.10^6$  UFC/ml après 24 heures de culture. Cette diminution peut être interprétée par l'effet antagoniste de la souche de *Lb. paracasei* à l'égard de *S. aureus* (S<sub>3</sub>), on suppose donc que cette souche a produit des substances ou des métabolites qui inhibent la croissance de *S. aureus*. (S<sub>3</sub>).

Une plus grande diminution du pH de la culture mixte (pH 4,8) par rapport à celui de la culture pure (pH 6,09) est enregistrée après 24 heures d'incubation.

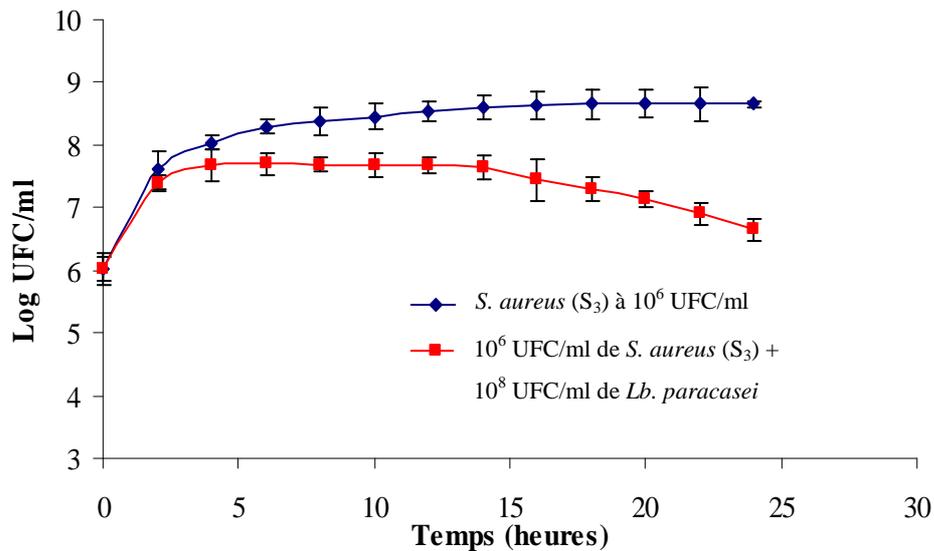
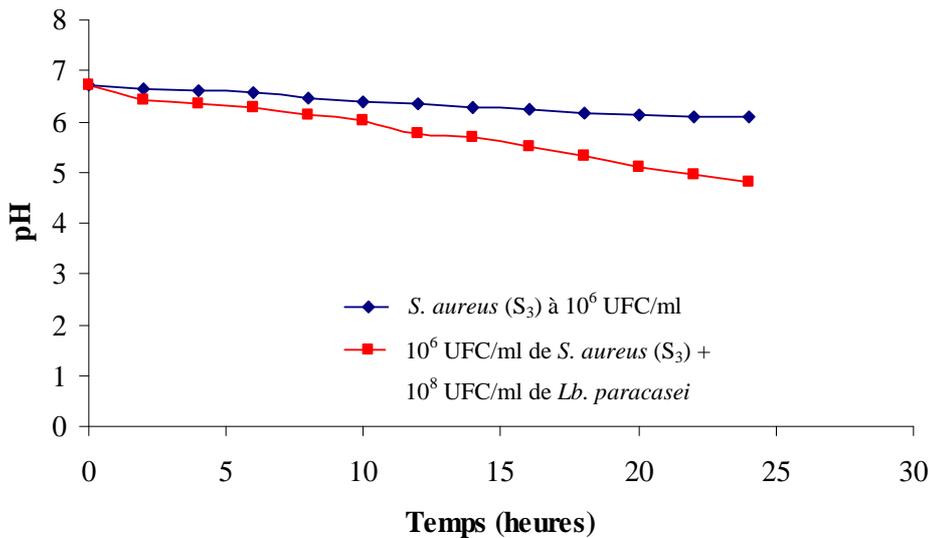


Figure 25 Cinétique de croissance de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) en culture mixte avec *Lb. paracasei* et en culture pure, dans le lait écrémé



**Figure 26** Evolution du pH de la culture mixte de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) avec *Lb. paracasei* et de la culture pure de *S. aureus* (S<sub>3</sub>), dans le lait écrémé

Une étude qui a porté sur 8 bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* isolées de lait de chèvre en Algérie, a montré que 3 de ces bactéries (*Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* et *Lb. rhamnosus*) pouvaient inhiber la croissance de *S. aureus* et que *Lb. rhamnosus* en culture mixte dans du lait écrémé stérile avec *S. aureus* réduisait la croissance de cette dernière de 1,6 Log après 24 h de culture et une inhibition totale de la souche a été enregistrée après 72 h. L'effet antagoniste de *Lb. rhamnosus* envers *S. aureus* est attribué à la production par cette dernière d'acides (lactique et acétique) et d'une substance protéique (bactériocine) (Anas et al., 2008).

En effet, des études ont montré que l'acidification du milieu de culture ou du lait par addition d'acide lactique jusqu'à un pH de 4,5-4,4, inhibait complètement la croissance de *S. aureus* (Charlier et al., 2008). Néanmoins en plus de la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques (lactique et acétique) envers *S. aureus* résultait de l'action de leur forme non dissociée. Effectivement, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération de protons, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Caplice et al., 1999). Cependant dans cette étude, le pH des cultures mixtes des souches (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) en présence de *Lb. paracasei*, est respectivement de 4,8 et 4,91 après 24 h de culture. Or, *S. aureus* peut croître à des pH entre 4,6 et 10 avec une croissance optimale à pH neutre (Charlier et al., 2008). Si le pH ne joue qu'un rôle mineur dans le phénomène d'inhibition de *S. aureus* on peut supposer que l'arrêt de sa

croissance est dû à l'accumulation d'autres substances anti-staphylococciques produites par *Lb. paracasei*.

**Otero et al. (2005)** ont observé en culture mixte une inhibition de la croissance de *S. aureus* par *Lactobacillus gasseri* en présence et en absence d'oxygène. Toutefois, ils ont constaté qu'en anaérobiose après 24 h d'incubation, la réduction de la croissance de *S. aureus* est de  $10^2$  UFC/ml par rapport à l'inoculum du départ qui est de  $10^4$  UFC/ml. Par contre en aérobiose, une inhibition totale de la croissance de *S. aureus* est observée après 24 h de culture. L'activité antibactérienne de *Lactobacillus gasseri* à l'égard de *S. aureus* est attribuée au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

**Karska-Wysocki et al. (2009)** ont constaté une réduction de  $2,99.10^3$  UFC/ml du nombre de SARM, par rapport à l'inoculum de départ qui est de  $3,18.10^6$  UFC/ml après 24 h de culture, en présence de *Lb. acidophilus* et *Lb. casei* dans du lait additionné de peptone. Une inhibition totale de la croissance de *S. aureus* est enregistrée après 48 h de culture. Ils ont conclu que l'association des deux souches (*Lb. acidophilus* et *Lb. casei*) avait un effet bactéricide vis-à-vis du SARM.

La compétition pour les nutriments joue un rôle important dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus*, ce dernier est un très mauvais compétiteur. En effet, Il a été rapporté que les lactobacilles pouvaient inhiber certains agents pathogènes par compétition nutritionnelle (**Rousseau, 2004 ; Charlier et al., 2008**).

**Iandolo et al. (1965)** ont montré que la diminution de la disponibilité des nutriments intervenait dans l'inhibition de *S. aureus* par *Lc. lactis* biovar. *diacetylactis*. **Haines et Harmon (1973)** ont également rapporté que la compétition pour les éléments nutritifs telles que la biotine et la niacine, interviendrait dans le mécanisme d'inhibition de *S. aureus* en culture mixte avec *Lc. lactis* dans le lait à 30°C.

L'étude statistique entre l'évolution de la croissance de la souche ( $S_3$ ) et ( $L_5$ ) en cultures mixtes avec *Lb. paracasei*, a révélé une plus grande diminution de la croissance de *S. aureus* ( $S_3$ ) comparée à la souche ( $L_5$ ) vis-à-vis de *Lb. paracasei* avec une différence hautement significative [ $P_{0,01} > P_{obs} > P_{0,001}$ ] après 20 heures de culture (**Tableau VII, Annexe 2**).

Par conséquent, la souche ( $S_3$ ) est retenue pour l'antagonisme *in vivo* sur lapins holoxéniques.

## **Chapitre IV. Etude *in vivo* de l'antagonisme de *Lb. paracasei* envers *S. aureus* (S<sub>3</sub>)**

### **1. Dénombrement de staphylocoques dans la flore fécale avant contamination**

L'étude a porté sur des lapins holoxéniques (flore microbienne non contrôlée), il a été donc important d'estimer le nombre des staphylocoques dans les selles des lapins avant de procéder à la contamination par la souche de *S. aureus* (S<sub>3</sub>). Après dénombrement, une moyenne de 2 Log (10<sup>2</sup> cellules de Staphylocoques/g de selles) a été enregistrée. Ce nombre bas de staphylocoques dans les selles est approximativement le même que celui trouvé par **Simonová et al. (2007)** qui ont étudié les caractéristiques des souches de *S. aureus* isolées à partir de 106 échantillons de selles de lapins appartenant à 16 fermes de la Slovaquie occidentale. Ils ont trouvé que le nombre total de staphylocoques variait de 1 à 1,8 Log. Ils expliquent, que ce nombre bas de staphylocoques dans les selles des lapins est un signe de bonne santé et que ces mêmes observations ont été faites au niveau de l'appareil gastro-intestinal des chiens.

La microflore digestive du lapin évolue avec l'âge, notamment au moment du sevrage. Elle est caractérisée par la dominance de bactéries anaérobies strictes du genre *Bacteroides*, que l'on retrouve à tous les niveaux du tube digestif. Clostridies et bifidobactéries sont aussi présents, mais l'autre particularité de la microflore du lapin réside dans le fait que la microflore aero-anaérobie facultative est moins importante quantitativement et ne comporte pas ou très rarement de lactobacilles en particulier chez le lapin sevré. De même, les entérocoques sont présents de façon irrégulière (**Guillot et Ruckebusch, 1994**).

### **2. Contamination des lapins et traitement par *Lb. paracasei***

#### **2.1. Implantation de *S. aureus* (S<sub>3</sub>)**

La contamination des lapins (Lots 1 et 2) avec une dose journalière de 5ml de lait contenant 1,5.10<sup>7</sup> UFC/ml de *S. aureus* a fait apparaître l'état diarrhéique au bout de 5 jours. Pendant ces cinq jours, le nombre de *S. aureus* a augmenté de 10<sup>2</sup> à 1,7. 10<sup>8</sup> UFC/g de selles (**Figure 27**).

D'après les résultats de la **figure 27**, on constate qu'il n'y a pas de différence significative [ $P_{obs} > P_{0,05}$ ] dans l'évolution de l'implantation de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) au niveau de la paroi intestinale et colique des lapins des Lots 1 et 2 (**Tableau VIII, Annexe 2**). Cependant l'état diarrhéique n'est pas apparu immédiatement après avoir administré une dose de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) de 1,5.10<sup>7</sup> UFC/ml. Cela serait dû au fait qu'un grand nombre de *S. aureus* a été détruit avant d'arriver à l'intestin grêle et au côlon. Cette diminution du nombre pouvait être le résultat de l'effet du pH gastrique, des sels biliaires ou de l'effet barrière de la microflore intestinale (**Nutri-Thema,**

2005). Par contre le nombre de *S. aureus* qui arrive à l'intestin (pH neutre) augmente suite à l'implantation et à la multiplication de cette souche. De plus, l'apport quotidien de *S. aureus* permet l'augmentation de ce nombre jusqu'à arriver à la dose infectante qui est de  $1,7 \cdot 10^6$  UFC/ml.

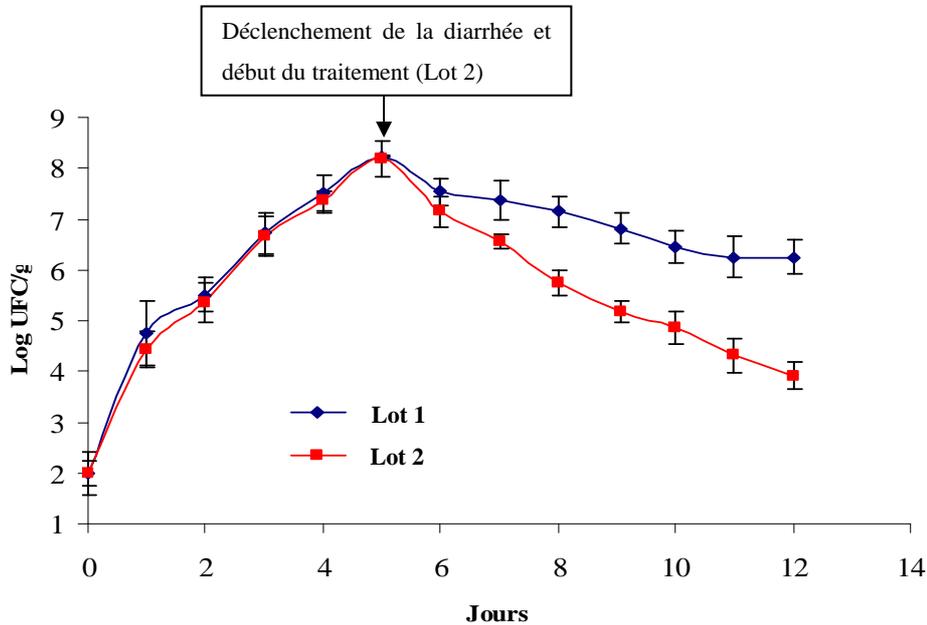


Figure 27 Evolution des comptes fécaux de *S. aureus* au cours de l'étude *in vivo*

L'implantation de *S. aureus* dans le côlon et l'intestin des lapins serait dû au fait que cette souche possède des adhésines à sa surface, reconnaissant différents récepteurs des cellules épithéliales ou en se fixant aux composants de la matrice extracellulaire de ces dernières. Les adhésines les mieux caractérisées de *S. aureus* sont celles qui reconnaissent le fibrinogène (ClfA), ou la fibrine, le collagène (Cna) et la fibronectine (FnbA et FnbB) (Bisognano, 2000). L'étude menée par Baba-Moussa *et al.* (2010) sur l'identification par PCR des gènes qui codent pour les adhésines et entérotoxines de 21 souches de *S. aureus* isolées de selles de patients diarrhéiques post antibiothérapie, a montré que sur les 21 souches, 100% possédaient le gène (*fnbA*) qui code pour l'adhésine qui se lie au fibronectine, 14% pour le (*fnbB*) et 95% pour clumping factor B (*clfB*) qui se lie à la fibrinogène. Concernant les entérotoxines produites : 62% des souches produisaient l'entérotoxine A, 38% l'entérotoxine B, 14% l'entérotoxine G, 81% l'entérotoxine LukE-LukD et aucune production pour les entérotoxines C, D, E, K, L et T.

## 2.2. Traitement des lapins par *Lb. paracasei*

Dès l'apparition d'une diarrhée persistante (cinquième jour), les lapins du Lot 1 ont reçu quotidiennement 5ml de lait écrémé stérile, et ceux du Lot 2 recevaient une dose journalière de 5ml de lait contenant  $2 \cdot 10^9$  UFC/ml de *Lb. paracasei* durant 7 jours. Chez les lapins du Lot 1

(non traités), l'état diarrhéique a persisté 4 jours après l'arrêt de la contamination. Durant cette période, l'état de santé des lapins s'est détérioré (diminution de prise d'aliments, changement de comportement). Au terme de cette période, on a noté que le volume des selles devenait de plus en plus grand avec un aspect mou. Par contre, le nombre de *S. aureus* dans les selles a diminué de  $1,7 \cdot 10^8$  à  $1,7 \cdot 10^6$  UFC/g en fin d'expérimentation (12<sup>ème</sup> jour) (**Figure 27**).

Cela est probablement dû à l'arrêt de la contamination mais aussi à l'effet de la microflore intestinale qui s'oppose à l'implantation de *S. aureus* « l'effet de barrière », du pH gastrique et des sels biliaires. Cependant la persistance de la diarrhée peut s'expliquer par une éventuelle présence des entérotoxines de *S. aureus* qui ont continué à agir sur le tractus gastro-intestinal des lapins et provoquer ainsi une diarrhée. En effet, il a été prouvé que les entérotoxines de *S. aureus* étaient résistantes aux enzymes protéolytiques telles que la trypsine, la chymotrypsine et la papaïne et quelles pouvaient résister à l'action des sucs digestifs, gastrique et intestinal (**Soriano et al., 2002**).

Il est connu que, les entérites aiguës causées par *S. aureus* sont le plus souvent dues à l'effet des entérotoxines produites par *S. aureus*. Cette maladie est davantage une intoxication qu'une infection. Les symptômes de cette intoxication peuvent se traduire par des crampes abdominales, nausée, vomissement, diarrhée, fièvre et la déshydratation et dans des cas graves, la mort peut être le résultat. Mais généralement la guérison se produit dans les 48 à 72 heures qui suivent l'intoxication (**Cuvelier, 2002 ; Bhatia et Zahoor, 2007**).

**Gravet et al. (1999)** ont prouvé expérimentalement que la production de l'entérotoxine A et de la leucotoxine LukE-LukD par *S. aureus* dégradait l'épithélium intestinal chez le lapin.

Une autre étude menée sur des singes a montré qu'après une contamination de ces derniers par inhalation d'une dose mortelle de la toxine B produite par *S. aureus* pendant 10 minutes, les singes ont développé des lésions pulmonaires ainsi qu'une gastroentérite après 24 h de contamination. 48 h après l'exposition à l'entérotoxine, les singes ont eu un début brusque de léthargie progressive, de la dyspnée et de la pâleur faciale, aboutissant à la mort ou à l'euthanasie. L'examen du côlon et de l'intestin des singes a révélé une dégradation de l'épithélium et la présence d'une réaction inflammatoire (**Ulrich et al., 2006**).

Une étude qui a porté sur les entérotoxines de *S. aureus* produites dans les fromages à pâte pressée cuite a révélé, que même après chauffage du caillé, s'il ya production d'entérotoxines avant chauffage, celles-ci pouvaient se maintenir dans le fromage jusqu'au produit final et constituer un risque pour le consommateur (**Lamprell, 2003**).

Concernant les lapins traités (Lot 2), le nombre de *S. aureus* a commencé à diminuer 24 h après le traitement. Cette diminution devient significative après 48 h de la prise du traitement

[ $P_{0,05} > P_{obs} > P_{0,01}$ ] comparé aux lapins du Lot 1, et elle est de 1,7 Log ( $1,58.10^8$  à  $3,5.10^6$  UFC/g) (**Tableau VIII, Annexe 2**). C'est au terme de cette période que l'état diarrhéique a disparu en notant la reprise de l'aspect et de la consistance des selles et une amélioration de l'état sanitaire des lapins. Au 7ème jour du traitement, les comptes fécaux de *S. aureus* des lapins du Lot 2 paraissent retrouver leur valeur initiale comparé à ceux du Lot 1 avec une différence très hautement significative [ $P_{obs} < P_{0,001}$ ]. Cette différence ne peut être expliquée que par le fait que les lapins du Lot 1, recevaient du lait fermenté au *Lb. paracasei* et ceux du Lot 2 ne prenaient que du lait écrémé stérile.

Les résultats obtenus au terme de cette étude montrent l'effet bénéfique du lait fermenté au *Lb. paracasei* contre la diarrhée causée par *S. aureus*. Cet effet bénéfique est exercé par plusieurs mécanismes d'action de *Lb. paracasei in vivo* à l'égard de *S. aureus*.

Effectivement, De nombreux effets protecteurs de certains probiotiques contre des infections intestinales ont été démontrés sur des modèles animaux. Les mécanismes impliqués incluent la production d'acides, de peroxyde d'hydrogène, de substances antimicrobiennes, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions antitoxines et la stimulation du système immunitaire (**Collins et Gibson., 1999 ; Hsiao-Ling et al., 2010**).

Une étude qui a porté sur les entérotoxines de *S. aureus* dans les fromages, a montré que l'utilisation d'un levain qui comportait des lactocoques, lactobacilles et des streptocoques thermophiles pour la fabrication d'un fromage suisse, a totalement éliminé *S. aureus* ainsi que ses entérotoxines A, B et D (**Lamprell, 2003**).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'adhésion des bactéries lactiques au tractus digestif. L'idée générale est qu'une forte adhésion de ces bactéries à l'épithélium intestinal interférerait avec celle des agents pathogènes par saturation des sites de fixation. Les bactéries lactiques capables d'adhérer *in vitro* à l'épithélium humain et animal sont principalement des lactobacilles et certaines bifidobactéries isolées de la microflore humaine (**Bernet Coconnier et al., 1993 ; Coconnier et al., 1993**).

En effet, **Vesterlund et al. (2006)** ont montré que l'adhérence de *S. aureus* au mucus intestinal humain *in vitro* a été réduite de 39 à 40% par l'association de *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, alors que l'association de *Lactobacillus reuteri*, *Lc. lactis* et *P. freudenreichii* réduisait l'adhésion de *S. aureus* de 27- 36%, après 2 h d'incubation.

Dans la plupart des cas, l'adhésion des bactéries probiotiques à la muqueuse intestinale est due à des protéines. Toutefois, d'autres molécules telles que les acides lipotéichoïques, polymères amphiphiles qui s'étendent à travers la couche de peptidoglycane de la paroi jusqu'à

la surface cellulaire, et les exopolysaccharides, polysaccharides à chaînes longues attachés de façon souple à la surface cellulaire ou secrétés dans le milieu, sont aussi impliqués dans l'adhésion de certaines souches (**Izquierdo alegre, 2009**).

**Roos et Jonsson (2002)** ont caractérisé une protéine de surface de grande taille qui contribue à l'adhésion de *Lb. reuteri* 1063 au mucus porcine et aviaire : la protéine Mub. De même, la protéine Msa de *Lb. plantarum* WCFS1 (232) et la protéine Mub de *Lb. acidophilus* NCFM (34) ont été identifiées comme adhésines du mucus.

**Marzotto et al. (2006)** ont rapporté (dans leur étude réalisée sur des enfants âgés de 12 à 24 mois alimentés avec un lait fermenté au *Lb. paracasei*) que *Lb. paracasei* survit dans les selles chez 92 % des enfants examinés, une semaine après l'administration du lait fermenté. Cela montre la capacité de la souche étudiée à passer à travers la barrière gastro-intestinale et à dominer temporairement la communauté des lactobacilles dans les différents environnements intestinaux.

Cependant, certaines bactéries lactiques ne survivent pas à l'environnement acide de l'estomac et ne répondent donc pas totalement à la définition des probiotiques. *Lc. lactis*, une espèce bactérienne largement utilisée dans des produits laitiers fermentés, est très sensible à l'acide et à la bile. Par contre la capacité de survie de certaines souches de *Lb. acidophilus*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum* et *Lb. casei* dans des conditions acides est prouvée (**Marteau et Shanahan, 2003**).

La dose ingérée de probiotique est aussi un facteur important pour obtenir des concentrations élevées dans les différents compartiments de tube digestif (**Izquierdo alegre, 2009**). En effet, la dose journalière thérapeutique pour un probiotique est de  $10^8$  à  $10^9$  cellules/ml (**Shimakawa et al., 2003**). Ainsi, la quantité de  $10^9$  *Lb. paracasei* /ml, administrée aux lapins, pourrait être suffisante pour obtenir un effet thérapeutique.

### **3. Etude des observations des coupes histologiques**

#### **3.1. Lapin sain (témoin)**

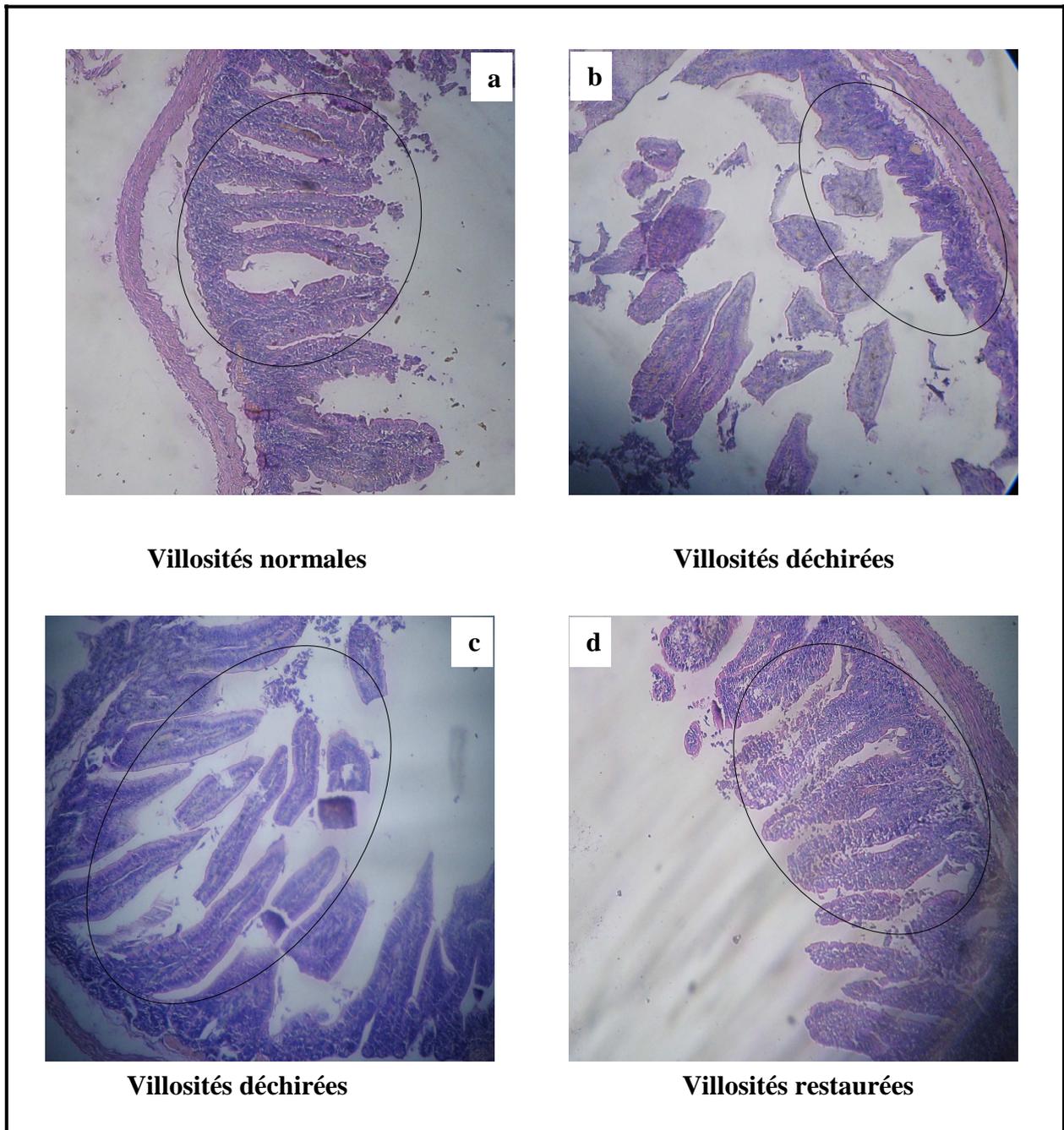
##### **- Intestin (Figure 28a)**

La paroi intestinale chez le lapin sain (témoin) est normale, formée de quatre couches : muqueuse, sous muqueuse, musculaire muqueuse et musculuse. Les valvules conniventes avec les villosités en forme cylindrique sont très apparentes.

##### **- Côlon (Figure 29a)**

La paroi colique est normale, constituée de quatre couches : muqueuse, sous muqueuse, musculuse et séreuse.

Les glandes tubuleuses sont droites et le chorion normal.



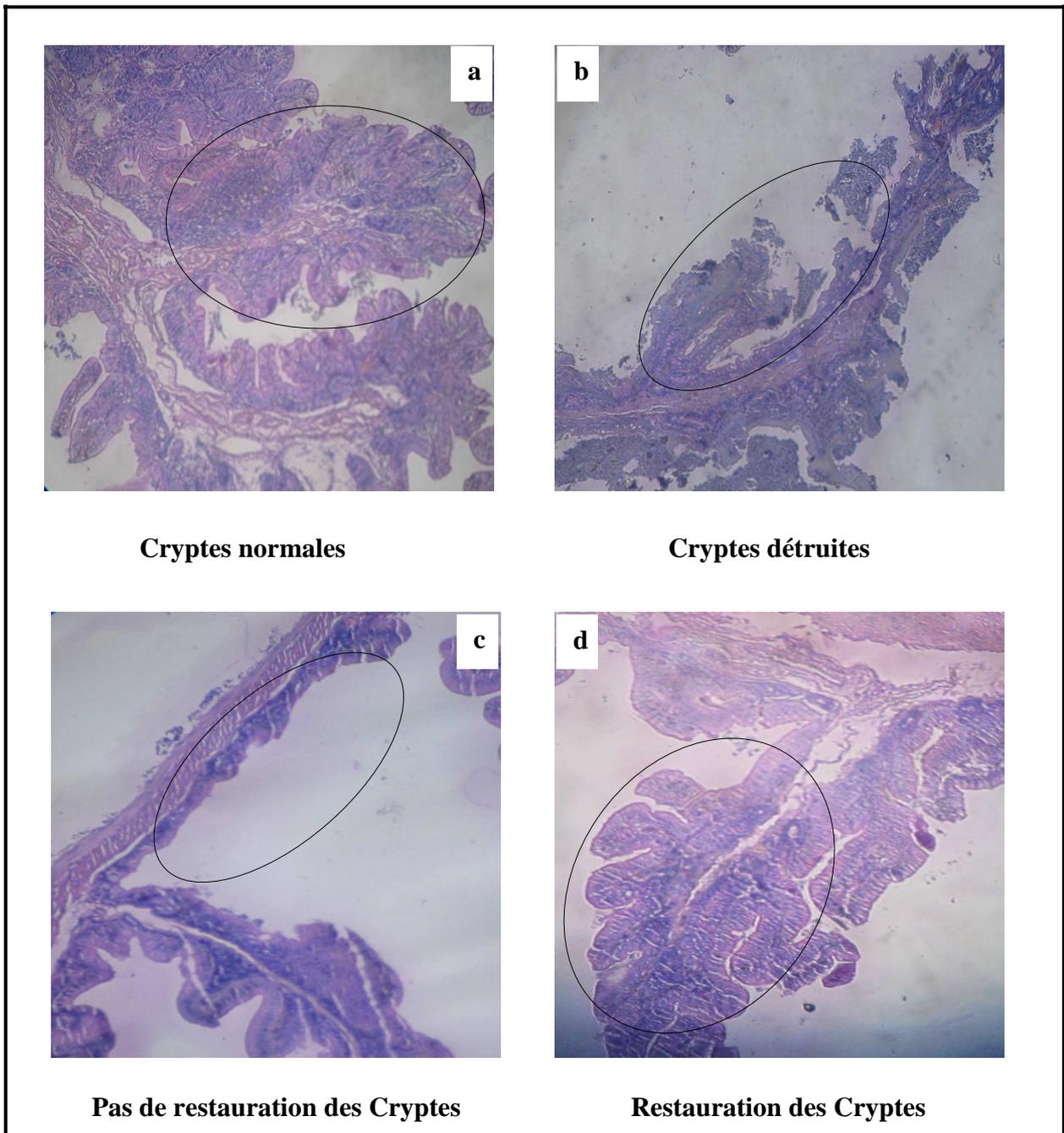
**Figure 28** Coupes histologiques des intestins grêles des lapins disséqués (x40).

**a** : Lapin sain (témoin)

**b** : Lapin diarrhéique (premier jour du déclenchement de la diarrhée)

**c** : Lapin diarrhéique non traité recevant le lait écrémé stérile

**d** : Lapin diarrhéique traité recevant le lait écrémé fermenté au *Lb. paracasei*



**Figure 29** Coupe histologiques des colons des lapins disséqués (x40)

**a** : Lapin sain (témoin)

**b** : Lapin diarrhéique (premier jour du déclenchement de la diarrhée)

**c** : Lapin diarrhéique non traité recevant le lait écrémé stérile

**d** : Lapin diarrhéique traité recevant le lait écrémé fermenté au *Lb. paracasei*

### 3.2. Lapin diarrhéique (premier jour du déclenchement de la diarrhée)

#### - Intestin (Figure 28b)

Les villosités de l'intestin grêle du lapin diarrhéique comparées à celles du témoin sain (Figure 28a), semblent déchiquetées aux extrémités supérieures et présentent une infiltration muqueuse par des globules blancs (Figure 30) ce qui indique une réaction inflammatoire probablement causée par *S. aureus* et ses entérotoxines.

La figure 30 illustre un exemple de réaction inflammatoire au niveau de la muqueuse intestinale du lapin diarrhéique.



**Figure 30** Coupe histologique de l'intestin du lapin diarrhéique (muqueuse infiltrée par des globules blancs × 60)

#### - Côlon (Figure 29b)

Les cryptes coliques du lapin diarrhéique comparées à celles du témoin sain (Figure 29a), présentent une atrophie des entérocytes, des lésions et une réaction inflammatoire.

Ces résultats correspondent à ceux rapportés par **Ulrich et al. (2006)**, concernant une expérimentation de la toxine B produite par *S. aureus* sur des singes, ils ont constaté qu'après développement d'une gastroentérite, les coupes histologiques des portions de l'intestin grêle ont montré une infiltration de la muqueuse par des leucocytes lymphoblastiques et des lésions au niveau des villosités ont été observées.

**Lin et al. (2009)** ont rapporté que les conséquences d'une gastroentérite due à *S. aureus* chez l'humain sont : une l'inflammation aiguë de la muqueuse intestinale, endommagement des cellules du relief épithélial et la présence de coques Gram positif (*S. aureus*).

Cependant, chez les enfants, les résultats d'une gastroentérite à *S. aureus* semblent être plus graves, et incluent également des ulcères, micro abcès au niveau de la muqueuse, et des débris nécrotiques contenant des colonies bactériennes et des neutrophiles (**Han et al., 1999**).

### **3.3. Lapin diarrhéique, non traité, recevant le lait écrémé stérile**

#### **- Intestin (Figure 28c)**

La muqueuse intestinale du lapin diarrhéique non traité par rapport à celle du témoin sain (Figure 28a), présente une distension des axes villositaires, des lésions et une réaction inflammatoire.

#### **- Côlon (Figure 29c)**

La muqueuse colique du lapin diarrhéique non traité par rapport à celle du témoin sain (Figure 29a), montre une atrophie des entérocytes avec un aspect cuboïdal et une infiltration de la muqueuse par des globules blancs.

On conclue que le lait écrémé sans *Lb. paracasei*, administré aux lapins diarrhéiques pendant les 7 jours, n'a pas eu un quelconque effet de rétablissement sur les muqueuses intestinale et colique de ces lapins.

### **3.3. Lapin diarrhéique traité recevant le lait écrémé fermenté au *Lb. paracasei***

#### **- Intestin (Figure 28d)**

La muqueuse intestinale du lapin traité par rapport à celle des lapins diarrhéiques (premier jour du déclenchement de la diarrhée et non traité) (Figure 28 b et c), apparait avec relief normal et présente des villosités avec une restructuration histologique apparente (forme cylindrique) et absence de réaction inflammatoire.

#### **- Côlon (Figure 29d)**

La muqueuse colique du lapin traité comparée à celle des lapins diarrhéiques (Figure 29 b et c), semble être régénérée avec un chorion non inflammatoire. Cela atteste de l'effet bénéfique escompté de *Lb. paracasei* administré durant la période du traitement. Bien que les conditions au niveau de l'intestin grêle et du côlon ne soient pas très propices à la croissance de *Lb. paracasei*, cela n'a pas empêché ce dernier d'exercer son effet bénéfique, permettant un meilleur rétablissement de l'état diarrhéique des lapins traités, et de même une restauration des muqueuses intestinales et coliques de ces derniers.

Cela confirme que cette restructuration a pu être favorisée par le probiotique en exerçant un effet antagoniste contre *S. aureus* et ces entérotoxines, par différents mécanismes, incluant : la production d'acides, de peroxyde d'hydrogène, de substances antimicrobiennes, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions antitoxines et la stimulation du système immunitaire (Collins et Gibson., 1999 ; Hsiao-Ling *et al.*, 2010)..

Les mêmes observations ont été faites par Hamma *et al.* (2008), en utilisant une souche de *B. infantis* à l'égard d'*Escherichia coli* entérotoxigène *in vivo* sur des lapins holoxéniques, ils

ont constaté un rétablissement de l'état diarrhéique des lapins traités avec *B. infantis* ainsi qu'une restauration des muqueuses intestinales et coliques de ces derniers.

Dans l'étude menée par **Hsiao-Ling et al. (2010)** en utilisant une souche de *Lb. paracasei* à l'égard d'*Escherichia coli* entéropathogène *in vivo* sur des souris, ils ont constaté une reconstitution des muqueuses intestinales des souris traitées avec *Lb. paracasei* comparées à celles contaminées par *E. coli* qui présentent des lésions au niveau de la muqueuse intestinal ainsi qu'un effacement des villosités et une réaction inflammatoire.

Les probiotiques interviennent très certainement dans la neutralisation de produits toxiques. Ils provoqueraient une atténuation du catabolisme intradigestif et une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'absorption des substances toxiques (ammoniac, amines et indole) et diminuer les bio transformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques. Les bactéries probiotiques auraient aussi la capacité de produire des métabolites susceptibles de neutraliser *in situ* certaines toxines bactériennes (**Robin et Rouchy, 2001**).

Les formes les plus connues de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique et la pochite. De nombreux travaux ont montré que certains microorganismes de la flore endogène pouvaient jouer un rôle nocif pro-inflammatoire au cours des maladies inflammatoires du tube digestif (**Marteau et al., 2003**). Ces constatations ont motivé les études sur les possibles effets bénéfiques des micro-organismes probiotiques dans la modulation des MICI. Des travaux ont ainsi suggéré des effets positifs des souches de *Lb. rhamnosus* GG et le mélange de probiotiques VSL#3<sup>®</sup> (*Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Sc. thermophilus*) dans la prévention des rechutes dans les cas de colites, de la pochite ou encore de la maladie de Crohn (**Izquierdo alegre, 2009**).

**Verdu et al. (2004)**, ont rapporté que l'effet de *Lb. paracasei* (probiotique) sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hypercontractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irrité.

*Conclusion*

## Conclusion

Cette étude a été consacrée dans un premier temps au criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* multirésistant.

Au préalable, un isolement et une identification de souches de *S. aureus* ont été effectués, à partir de lait de vaches mammites et de selles de patients diarrhéiques soumis à une antibiothérapie. Au total, 15 souches de *S. aureus* ont été isolées, dont 10 de laits mammites et 5 des selles.

Après isolement des souches de *S. aureus*, des antibiogrammes ont été réalisés afin de sélectionner celles qui sont résistantes aux antibiotiques. Deux souches multirésistantes ont été choisies, une des selles (S<sub>3</sub>) et l'autre de lait mammitique (L<sub>5</sub>). La souche (S<sub>3</sub>) est celle qui présente le plus de multirésistance, elle est résistante à la céfoxitine, par conséquent à la méthicilline et à toutes les bêta-lactamines.

Une fois les souches de *S. aureus* multirésistantes sélectionnées, un criblage de six (6) souches de bactéries lactiques (*Enterococcus faecalis* (1), *Enterococcus faecalis* (2), *Enterococcus* sp., *Lc. lactis* (1), *Lc. lactis* (2) et *Lb. paracasei*) à l'égard de ces dernières a été effectué par le test des spots. Il ressort que *Lb. paracasei* est la souche de bactérie lactique qui a témoigné de la meilleure antibiose envers *S. aureus* (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) avec respectivement des diamètres de zones d'inhibitions de 20 et 18mm.

Pour savoir si *Lb. paracasei* a un impact sur la perméabilisation de la membrane de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>), traduit par la fuite des ions K<sup>+</sup>, la concentration externe de ces derniers est mesurée dans les surnageants des cultures pures et mixtes. Les résultats ont montré une plus grande fuite d'ions K<sup>+</sup> du contenu cytoplasmique de la souche (S<sub>3</sub>) par rapport à la souche (L<sub>5</sub>), avec des concentrations respectivement de 61,8mg/l et 53mg/l de potassium.

L'effet antagoniste a également été étudié dans le lait écrémé, en présence de 10<sup>6</sup> UFC/ml de *S. aureus* et 10<sup>8</sup> UFC/ml de *Lb. paracasei*, avec le suivi de l'évolution du pH des cultures pures et mixtes. Au terme de cette étude, des différences significatives ont été enregistrées en cultures mixtes par rapport aux cultures pures. En effet, en présence de 10<sup>8</sup> UFC/ml de *Lb. paracasei* une réduction de 2 et 1,5 unités logarithmiques respectivement pour les souches (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) par rapport aux témoins, a été observée après 24h de culture. Il a été noté aussi que l'évolution de la croissance des souches (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) dans le lait écrémé en présence de *Lb. paracasei*, a révélé une plus grande réduction de la croissance de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) comparée à la souche (L<sub>5</sub>) avec une différence hautement significative après 20 heures de culture.

La souche (S<sub>3</sub>) a été alors retenue pour l'étude de l'effet antibactérien *in vivo* sur lapins holoxéniques.

L'effet antibactérien, *in vivo*, de *Lb. paracasei* envers *S. aureus* (S<sub>3</sub>), a été clairement démontré. Après apparition de l'état diarrhéique chez les lapins des Lots 1 et 2, au cinquième jour de la contamination par *S. aureus* (S<sub>3</sub>), lorsque ce dernier atteint un taux cellulaire de 6 Log. une nette diminution du nombre de *S. aureus* (2,33 Log) dans les fèces des lapins traités (Lot 2) comparés à ceux non traités (Lot 1), a été observée au septième jour de traitement. Suite à ces résultats, une étude microscopique de portions d'intestin grêle et du côlon a été réalisée. Les résultats ont montré une restauration des villosités intestinales et des cryptes coliques chez les lapins diarrhéiques traités par *Lb. paracasei* par rapport au témoin diarrhéique (premier jour du déclenchement de la diarrhée) et au lapin diarrhéique, non traité, recevant le lait écrémé stérile. Chez ces derniers, les villosités et les cryptes apparaissent atrophiées et détériorées par l'action de *S. aureus* (S<sub>3</sub>).

Ces résultats plaident en faveur de l'utilisation de *Lb. paracasei* comme probiotique contre les diarrhées associées aux antibiotiques causées par *Staphylococcus aureus*.

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

La détection et la caractérisation des entérotoxines produites par *S. aureus* par des techniques immunologique de biologie moléculaire et l'évolution de leur production en présence de *Lb. paracasei*.

La recherche de l'activité antibactérienne de *Lb. paracasei* envers d'autres espèces responsables des diarrhées associées aux antibiotiques.

La mise en évidence de la nature des substances antibactériennes produites par *Lb. paracasei*, leur purification et caractérisation. Ces métabolites pourraient éventuellement être une alternative aux antibiotiques pour traiter les mammites et autres maladies où *S. aureus* multi-résistant est impliqué. De même, *Lb. paracasei* pourrait être ajouté au lait cru (où *S. aureus* est présent) destiné à la fabrication de fromages du terroir.

*Références  
bibliographiques*

## A

- Adams, M.R.**, 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 68, 171-178.
- Al alam, D.**, 2008. Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales et bronchiques et *Staphylococcus aureus* sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Thèse de Doctorat en Immunologie. Université de Reims (France), 164p.
- Ammor, M.S.**, 2004. Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en Physico-chimie et Qualité des Bioproduits. Université de Rennes (France), 125p.
- Anas, M., Henni, J.E., Kihal, M.**, 2008. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Sciences* 3 (2), 39-49.
- André, M.C.D.P.B, Hidalgo Campos, M.R., Jayme Borges, L., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, A.B.**, 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control* 19, 200-207.
- Asseray, N., Caillon, J., Roux, N., Jacqueline, C., Bismuth R., Kergueris, M. F., Potel, G., Bugnon, D.**, 2002. Different aminoglycosideresistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus aureus* endocarditis infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1591-3.
- Aubry-Damon, H., Legrand, P., Brin-Buisson, P., Astier, A., Soussy, C.J., Leclercq, R.**, 1997. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. *Clinical Infectious Diseases* 25, 647-53.
- Axelsson, L.**, 1990. *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. Departement Microbiology; University of Agricultural Sciences, Uppsala (Sweden), 64p.
- Axelsson, L.**, 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. Ed. Marcel Dekker (New York), 1-66.
- Axelsson, L., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., Lindgren, S.E.**, 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbes Ecology in Health and Disease* 2, 131-136.

## **B**

- Baba-Moussa, L.,** Ahissou<sup>1</sup>, H., Azokpota, P., Assogba, B., Atindéhou, M. M., Anagonou, S., Keller, D., Sanni, A., Prévost, G., 2010. Toxins and adhesion factors associated with *Staphylococcus aureus* strains isolated from diarrhoeal patients in Benin. *African Journal of Biotechnology* 9 (5), 604-611.
- Baliarda, A.,** 2003. Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*, approches physiologiques et génétiques. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition. Université de Bordeaux (France), 175p.
- Bartlett, J.G.,** 1992. Antibiotic-associated diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* 15, 573-581.
- Bartlett, J.G.,** 2002. Antibiotic-associated diarrhea. *New England Journal of Medicine* 346, 334-9.
- Batard, É.,** Ferron-Perrot, C., Caillon, J., Potel, G., 2005. Antibiothérapie des infections causées par *Staphylococcus aureus*. *Actualité thérapeutique* 11, 6.
- Bazarre, T.L.,** Wu, L., Yuhas, J.A., 1983. Total and HDL-cholesterol concentrations following yogurt and calcium supplementation. *Nutrition Reports International* 28, 1225-1232.
- Bendali, F.,** 2009. Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antagoniste à l'égard de *listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université A. MIRA de Béjaïa, 130p.
- Bendali, F.,** Gaillard-Martinie, B., Hebraud, M., Sadoun, D., 2008. Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *LWT.Food Science and Technology* 41, 1784-1792.
- Benthin, S.,** Villadsen, J., 1995. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 647-654.
- Bernet, M.F.,** Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4121-4128.
- Bertrand, X.,** Muller, A., Thouverez, M., Talon, D., 2004. Retour vers la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) : relation entre génotype et antibiotype. *Pathologie et Biologie* 52, 480-5.
- Bhatia, A.,** Zahoor, S., 2007. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2, 188-197.
- Bhunja, A. K.,** 2008. *Staphylococcus aureus* in Foodborne Microbial Pathogens. Ed. Springer (New York), 276p.

**Bisognano, C.**, 2000. Impact de la résistance aux antibiotiques et aux fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. Thèse de Doctorat en Sciences, mention Biologie. Faculté des sciences de l'Université de Genève (Suisse), 110p.

**Boclé, J.C.**, 2005. Effet des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'Homme adulte. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. 1-128.

**Boulbina, I.**, Driss, W., Tazka, H., Bouziane, A.M., 2009. Diagnostic bactériologique des mammites des vaches laitières dans quelques communes de la wilaya d'Alger (Baraki, Eucalyptus et Ouled Chebel) in Les maladies infectieuses des bovins. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El Harrach – Alger. 40p.

**Bourgeois, C.M.**, Larpent, J.P., 1996. Microbiologie alimentaire. T. 2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed. II, Tec. et Doc., Lavoisier (Paris), 523p.

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

## C

**Calo-Mata, P.**, Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., Barros-Velazquez, J., 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess and Technology* 1, 43-63.

**Caplice, E.**, Fitzgerald, G. F., 1999. Food fermentation: role of microorganismes in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-49.

**CA-SFM**, 2009. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations.

**Castala, E.**, Montel, M. C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal Food Microbiology* 126, 271-273.

**Charlier, C.**, Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y., 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 131, 30–39.

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

**Chen, G.**, Russell, J.B., 1989. Transport of glutamine by *Streptococcus bovis* and conversion of glutamine to pyroglutamic acid and ammonia. *Journal of Bacteriology* 171, 2981-2985.

**CINQ**, Comité sur les Infections Nosocomiales du Québec, 2005. Prévention et contrôle de la diarrhée nosocomiale associée au *Clostridium difficile* au Québec. Ed. III. Direction des risques biologiques environnementaux et occupationnels. 87p.

**Coconnier**, M.E., Bernet, M.F., Kernéis, S., Chauvière, G., Fourniat, J., Servin, A.L., 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion, *FEMS Microbiology Letters* 110, 299- 306.

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

**Collins**, M.D., Gibson, G.R., 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition* 69, 1052-1057.

**Corne**, P., 2004. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques et Chimiques de la Santé. Université de Montpellier (France), 116p.

**Cuvelier**, C., 2002. Infections de l'intestin grêle. *Acta Endoscopica* 32, 157-166.

## D

**Daurel**, C., Leclercq, R., 2008. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires* 407, 81-90.

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

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

**de Roissart**, H., Luquet, F.M., 1994. Bactéries lactiques. Vol.1. Aspect fondamentaux et technologiques. Ed. Lorica (Uriage), 605p.

**De Simone**, C., Ciardi, A., Grassi, A., Lambert Gardini, S., Tzantzoglou, S., Trincheri, V., 1992. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 14, 331-340.

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

- De Vrese, M.,** Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., Schrezenmeir, J., 2001. Probiotics-Compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 421S-429S.
- Deegan, L.H.,** Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058-1071.
- Deleo, F.R.,** Chambers, H.F., 2009. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. A review. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 2464–2474.
- Dellaglio, F.,** de Roissar, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques in Bactéries lactiques. T. 1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Lorica (Uriage), 614p.
- Delmee, 2003.** Les microorganismes impliqués dans les infections du tractus digestif. 1-3.
- Desmazeaud, M.J.,** de Roissart. H., 1994. Métabolisme générale des bactéries lactiques in bactéries lactiques. T. 1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Lorica (Uriage), 614p.
- Deverriere, B.V.M.,** 2007. Reproduction expérimentale de mammites à *Staphylococcus aureus* chez la brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires. Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse (France), 138p.
- Diekema, D.J.,** Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N., Beach, M., 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997- 1999. *Clinical Infectious Diseases* 32, 114-132.
- Diouf, S.,** Sarr, M.S., Abdellahi, O.C., Fall, M., 1990. Malnutrition et diarrhée chez l'enfant au CHU de Dakar. Aspect clinique, épidémiologique et biologique. *Médecine d'Afrique Noire* 37 (2), 29-32.
- Dortu, C.,** Thonart, P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13(1), 143-154.
- Drouault, S.,** Corthier, G., 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research* 32, 101–117.
- Duijkeren, E.,** Wagenaar, J.A., 2007. MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerging infectious disease* 13, 630-632.

## **E**

**Eady**, E.A., Cove, J.H., 2003. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* - an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16, 103-124.

**Earnshaw**, R.G., 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems In *The lactic acid bacteria in health and disease*. Vol. 1. Ed. Wood (London), 305p.

**Efuntoye**, M.O., Adetosoye, A.I., 2003. Enterotoxigenicity and drug sensitivity of Staphylococci from children aged five years and below with sporadic diarrhoea. *African Medical Journal* 12, 656-659.

**Eijsink**, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F., 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3275-3281.

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

**EU**, 2003. DIRECTIVE 2003/99/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. Official Journal of the European Union.

## **F**

**FAO/OMS**, 2001, The Food and Agriculture Organisation of the United Nations and the World Health Organisation Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO. 10-1.

**Fernandes**, C.J., Fernandes, L.A., Collignon, P., 2005. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 506-510.

**Fernández**, M., Martinez-Bueno, M., Martin, M.C., Valdivia, E., Maqueda, M., 2007. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1350-1361.

**Fimland**, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G. H., Nissen-Meyer, J., 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of Bacteriology* 182, 2643-2648.

**Flemming, K., Ackermann, G., 2007.** Prevalence of Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* in Stools of Patients with Nosocomial Diarrhea. *Infection* 35 (5), 356-358.

**Fluit, A.C., Wielders, C.L., Verhoef, J., Schmitz, F.J., 2001.** Epidemiology and susceptibility of 3051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3727-3732.

**Fox, L., Bayles, K.W., Bohach, G.A., 2001.** *Staphylococcus aureus* Mastitis in “*Staphylococcus aureus Infection and Disease*”. Ed. Kluwer Academic Publishers (New York), 342p.

**Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C., 2000.** Précis de Bactériologie clinique. Ed. Eska (Paris), 1692 p.

## **G**

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

**Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2005.** The Revised Road Map to the Manual *in* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ed. II. vol. 2. Springer (New York), 159–220.

**Garrity, G.M., Holt, J.G., 2001.** Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. II. Castenholz (New York), 155-166.

**Gilliland, S.E., 1990.** Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87, 175-188.

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

**Gravet, A., Rondeau, M., Harf-Monteil, C., Grunenberger, F., Monteil, H., Scheftel, J.M., Prévost, G., 1999.** Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-LukD. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 4012-9.

**Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V., 2001.** Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50, 245–259.

**Guillot, J.F., Ruckebush, Y., 1994.** Microflore digestive des animaux *in* Bactéries lactiques. Vol 2, Ed. Loriga (France), 341-366.

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

## **H**

**Haines, W.C., Harmon, L.G., 1973.** Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Applied Microbiology* 25, 436-441.

- Hamama, A.**, El Hankouri, N., El Ayadi, M., 2002. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *International Dairy Journal* 12, 933-938.
- Hamma, S.**, Nicoletti, C., Sadoun, D., 2008. The effect of fermented milk with *Bifidobacterium infantis* on intestinal disorders in the case of antibiotherapy with amoxicillin and contamination with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *African Journal of Biotechnology* 7(22), 4181-4191.
- Han, S.J.**, Jung, P.M., Kim, H., Kim, J.E., Hong, J., Hwang, E.H., Seong, I., 1999. Multiple intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enteritis in infants. *Journal of Pediatric Surgery* 34, 381-386.
- Heczko, P.B.**, Hoffler, U., Kasprowicz, A., Pulverer, G., 1981. Studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 14, 233-241.
- Hickson, A.**, D'Souza, A.L., Muthu, N., Rogers, T.R., Want, S., Rajkumar, C., Bulpitt, C.J., 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal* 335, 80-83.
- Hiramatsu, K.**, 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases* 1, 147-55.
- Hiramatsu, K.**, Okuma, K., Ma, XX., Yamamoto, M., Hori, S., Kapi, M., 2002. New trends in *Staphylococcus aureus* infections: glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15, 407-413.
- Hobbs, J.K.**, Miller, K., O'Neill, A.J., Chopra, I., 2008. Consequences of daptomycin-mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 321, 10-1093.
- Hould, R.**, 1984. Techniques d'histologie et de cytopathologie. Ed. Décarie (Montréal), 303p.
- Hsiao-Ling, C.**, Yi-Wen, L., Chua-Shn, C., Te-Wei, C., Willie, L., Chih-Ching, Y., Ming-Fong, L., Ming-Yu, T., Chuan-Mu, C., 2010. Probiotic *Lactobacillus casei* Expressing Human Lactoferrin Elevates Antibacterial Activity in the Gastrointestinal Tract. *Biometals* 10, 10534-9298.
- Huang, L.**, Forsberg, C.W., Gibbins, L. N., 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1230-1234.
- Huttunen, E.**, Noro, K., Yang, Z., 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *International Dairy Journal* 5, 503-513.

## I

**Iandolo, J. J., Clark, C.W., Bluhm, L., Ordal, Z.J., 1965.** Repression of *Staphylococcus aureus* in Associative Culture. *Applied Microbiology* 13(5), 646-649.

**Idoui, T., Boubjerda, D., Leghouchi, E., 2009.** Les mammites bovines dans la région de Jijel : identification des agents étiologiques *in* Les maladies infectieuses des bovins. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El Harrach – Alger. 40p.

**Isaacs, K., Herfarth, H., 2008.** Role of probiotic therapy in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases* 14, 1597-1605.

**Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., Salminen, S., 2000.** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy* 30, 1604-1610.

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

**Izquierdo alegre, E., 2009.** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de Doctorat en Chimie Analytique. Université de Strasbourg (France), 230p.

## J

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

**Jay, J.M., 1986.** Modern Food Microbiology. Ed. III. Van Nostrand Reinhold (New York), 234p.

## K

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

**Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E., 2001.** Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076-1079.

**Kaltenbach, G., Heitz, D., 2004.** Diarrhées associées aux antibiotiques chez le sujet âgé. *La Revue de Médecine Interne* 25, 46-53.

**Karska-Wysocki, B., Bazo, M., Smoragiewicz, W., 2009.** Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research* 2006, 1-13.

**Kashket, E.R., 1987.** Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Review* 46, 233-244.

- Kaszanyitzky-Juhász, E.,** Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, A., van der Graaf-van Bloois, L., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., 2007. MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerging infectious disease* 13(4), 630-632.
- Keramane, B.,** 2009. Effets antibactériens des lactocoques à l'égard de *Staphylococcus aureus* multi-résistant. Mémoire de Magister en microbiologie appliquée. 90p.
- Kérouanton, A.,** Hennekinne J.A., Letertre C., Petit L. Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115, 369–375.
- Klaenhammer T.R.,** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12, 39-85.
- Klaenhammer, T.R.,** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- Klein, G.,** Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 41, 103-125.
- Kong, S.,** Davison, A.J., 1980. The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH, e<sup>-</sup> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 204, 18-29.
- Kovacs-Zomborszky, M.,** Kreizinger, F., Gombos, S., Zomborszky, Z., 1994. Data on the effect of the probiotic “Lacto Sacc”. *Acta Veterinaria Hungarica* 42, 3-14.
- Krockel, L.,** Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Bantleon, A., Ludwig, W., 2003. *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 513-517.
- Kwon, N.H.,** Park, K.T., Moon, J.S., Jung, W.K., Kim, S.H., Ki, J.M., Hong, S.K., Koo, H.C., Joo, Y.S., Park, Y.H., 2005. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 624–632.
- L**
- Labioui, H.,** Elmoualdi, L., El Yachoui, M., Ouhssine., M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* 144, 237-250.
- Lamprell, H.,** 2003. Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. Université de Bourgogne (France), 79p.
- Le Loir, Y.,** Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. A review. *Genetics and Molecular Research* 2, 63-76.

**Leclercq, R.**, 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* 34, 482-92.

**Leclercq, R.**, Soussy, C.J., Weber, P., Moniot-ville, N., Dib, C., 2003. Activité *in vitro* de la pristinamycine vis-à-vis des staphylocoques isolés dans les hôpitaux français en 1999-2000. *Pathologie et Biologie* 51, 400-4.

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

**Lepelletier, D.**, Richet, H., 2001. Surveillance and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in French hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 22, 677-682.

**Leroy, F.**, De Vuyst, L., 2005. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *International Journal of Food Microbiology* 100, 141–152.

**Lin, Z.**, Kotler, D.P., Schlievert, P.M., Sordillo, E.M., 2009. Staphylococcal Enterocolitis: Forgotten but Not Gone? *Digestive Diseases and Sciences* 10, 1-8.

**Lindgren, S.E.**, Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Review* 7, 149-63.

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

**Lollai, L.A.**, Ziccheddu, M., Di Mauro, C., Manunta, D., Nudda, A., Leori, G., 2008. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995–2004). *Small Ruminant Research* 74, 249–254.

## **M**

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

**Marteau, P.**, Seksik, P., Shanahan, F., 2003. Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 17, 47-61.

**Marteau, P.**, Shanahan, F., 2003. Basic aspect and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 17, 725-740.

- Martin-Visscher**, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittal, R.M., Zheng, J., McMullen, L., Vederas, J., 2008. Isolation and characterisation of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (15), 4756-4763.
- Marzoto**, M., Maffei, C., Paternoster, T., Ferrario, R., Rizzolli, L., Pellegrino, M., Dellaglio, F., et Torriani, S., 2006. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the faecal microbiota of healthy infants. *Research in Microbiology* 157, 857-866.
- Matthias**, A.E., Rudi, F.V., 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. A review. *Trends in Food Science and Technology* 16, 31-42.
- McAuliffe**, O., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Review* 25, 285-308.
- McFarland**, L.V., 1995. Epidemiology of infectious and iatrogenic nosocomial diarrhea in a cohort of general medicine patients. *American Journal of Infection Control* 23, 295-305.
- McFarland**, L.V., 1998. Facteurs de risque de la diarrhée associée aux antibiotiques. *Annales de Médecine Interne* 149, 261-266.
- Melchior**, M.B., Vaarkamp, J., Fink-Gremmels, H., 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal* 171, 398-407.
- Messens**, W., De Vuyst, L., 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. *International Journal of Food Microbiology* 72, 31-43.
- Meurman**, J.H., Antila, H., Korhonen, A., Salminen, S., 1995. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 51303) on the growth of *Streptococcus dobrinus* *in vitro*. *European Journal of Oral Sciences* 103, 253-258.
- Mofredj**, A., Bahloul, H., Chanut, C., 2007. *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste. Revue générale. *Médecine et Maladies infectieuses* 37, 200-207.
- Montville**, T.J., Chen, Y., 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 511-519.
- Moon**, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y.H., Park, Y.H., Joo, Y.S., Koo, H.C., 2007. Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *Journal of Dairy Science* 90, 1176–1185.
- Morandi**, S., Brasca, M., Alfieri, P., Lodi, R., Tamburini, A., 2005. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Lait*, 181-192.
- Motlagh**, A.M., Johnson, M.C., Ray, B., 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *Journal of Food Protection*, 873-878.

**Mylonakis, E., Ryan, E.T., Calderwood, S.B., 2001.** *Clostridium difficile* associated diarrhea: a review. *Archives of Internal Medicine* 161, 525–33.

## N

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

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

**Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., 2003.** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2975-2984.

**Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Paris, A., Santagad, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G.V., 2007.** Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115, 290–296.

**Nutri-Thema, 2005.** Effet de barrière : rôle de la flore intestinale et de son environnement. Ecosystème digestif. Ed. V. La lettre d’information des Laboratoires Le Stum.

## O

**OMS, 2006.** Le traitement de la diarrhée : manuel à l’usage des médecins et autres personnels de santé qualifiés. 1-5.

**OMS, 2008.** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 9ème Rapport, d’évaluation (Septembre 2006 à Août 2007). Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. 177p.

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

**Otero, M.C., Nader-Macías, M.E., 2005.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science* 96, 35–46.

## P

**Papagianni, M., 2003.** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances* 21, 465- 499.

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

**Peacock, S.J.**, de Silva, I., Lowy, F.D., 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus* ? *Trends in Microbiology* 9, 605-10.

**Peles, F.**, Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, K., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* 118, 186-193.

**Pelisser, M.R.**, Klein, C.S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R., Arisi1, A. C. M., 2009. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 145-148.

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

## **R**

**Rahal, K.**, Ameer, A., Bouyoucef, A., Kaidi, R., 2009. Epidémiologie des mammites chez les bovins laitiers, dans la région de la Mitidja in Les maladies infectieuses des bovins. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El Harrach – Alger. 40p.

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

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

**Reinoso, E.B.**, El-Sayed, A., Lammler, C., Bognia, C., Zschock, M., 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research* 163, 314-322.

**Reverso, 2007.** Dictionnaires français de définitions et de synonymes.

<http://dictionnaire.reverso.net/francais-definition/arthritis>

**Richard, C.**, Canon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prevost, H., Drider, D., 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology* 23, 175-183.

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

**Robin, J.M.**, Rouchy, A., 2001. Les probiotiques. Nutrithérapie info. Centre d'Etude et de Développement de la Nutrithérapie. 4p.

**Roos, S.,** Jonsson, H., 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology (Reading, United Kingdom)* 148, 433-442.

**Rousseau, V.,** 2004. Evaluation d'oligosaccharides a effet prebiotique vis-a-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat en Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (France), 186p.

## **S**

**Sarker, S.A.,** Sultana, S., Fuchs, G.J., Alam, N.H., Azim, T., Bruëssow, H., Hammarström, L., 2005. *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. *Pediatrics* 116, 221-228.

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

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

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

**Shewmaker, P.L.,** Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Carvalho, M.D.G.S., Elliott, J.A., Joyce, K., Barrett, T.J., Teixeira, L. M., Facklam, R.R., 2004. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1505-1510.

**Shimakawa, Y.,** Matsubara, S., Yuki, N., Ikeda, M., et Ishikawa F., 2003. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain yakult-fermented soy milk as a probiotic food. *International Journal of Food Microbiology*. 81 (2), 131-136.

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

**Simeao do carmo, L.,** Souza dias, R., Roberto linardi, V., 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* 19, 9-14.

**Simeoni, U.,** 2000. Déshydratation aigue du nourrisson. 1-8.

**Simonová, M.,** Fotta, M., Lauková, A., 2007. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from Rabbits. *Folia Microbiologica* 52 (3), 291-296.

**Slotwiner-Nie P.K.,** Brandt, L.J., 2001. Infectious diarrhea in the elderly. *Gastroenterology Clinics of North America* 30, 625-35.

**Smith, J.L.,** Palumbo, S.A., 1983. Use of starter cultures in meats. *Journal of Food Protection* 46, 997- 1006.

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

**Soriano, J.M.,**Font, G., Moltó, J.C., Mañes, J., 2002. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends in Food Science and Technology* 13, 60-67.

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

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

**Szymanski, H.,** Pejcz, J., Jawien, M., Chmielarczyk, A., Strus, M., Heczko, P.B., 2006. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains-A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23, 247-253.

## T

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

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

**Tiemersma, E.W.,** Bronzwaer, S.L., Lytykainen, O., Degener, J.E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundman, H., 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases* 10, 1627-1634.

**Tomita, K.,** Akaza, H., Nomoto, K., Yokokura, T., Matsushima, H., Homma, Y., Aso, Y., 1994. Influence of *Lactobacillus casei* on rat bladder carcinogenesis. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 85, 655-663.

**Tran, U.,** Boyle, T., Shupp, J. W., Hammamieh, R., Jett, M., 2006. Staphylococcal enterotoxin B initiates protein kinase C translocation and eicosanoid metabolism while inhibiting thrombin-induced aggregation in human platelets. *Molecular and Cellular Biochemistry* 288, 171-178.

**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.

## U

**Ulrich, R.G.,** Wilhelmsen, C.L., Krakauer, T., 2006. Staphylococcal enterotoxin B and related toxins. *Medical Aspects of Biological Warfare* 14, 311-322.

## V

**Van der Meer-Marquet**, N., Domelier, A.S., Girard, N., 2004. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5650-7.

**Van't Veer**, P., Dekker, J.M., Lamers, J.W., Kok F.J., Shouten, E.G., Brants, H.A., Sturmans, F., Hermus, R.J., 1989. Consumption of fermented milk products and breast cancer: a case-control study in the Netherlands. *Cancer Research* 49, 4020- 4023.

**Vandenesch**, F., Naimi, T., Enright, M.C., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., Etienne, J., 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying pantonvalentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases* 9, 978-84.

**Verdu**, E.F., Bercik, P., Bergonzelli, G.E., Huang, X.X., Blennerhasset, P., Rochat, F., Fiaux, M., Mansourian, R., Corthesy-Theulaz, I., Collins, S.M., 2004. *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 127, 826-837.

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

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

**Vinderola**, C.G., Costa, G.A., Regenhardt, S., Reinheimer, J.A., 2002. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy journal* 12, 579-589.

**Von Mollendorff**, J.W., Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2006. Comparison of Bacteriocins Produced by Lactic-Acid Bacteria Isolated from Boza, a Cereal-based Fermented Beverage from the Balkan Peninsula. *Current Microbiology* 53, 209-216.

## W

**Wang**, L.L., Johanson, E.A., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 624-629.

**Weems**, J.J., 2001. The many faces of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations. *Postgraduate Medical* 110, 35-26.

**Weese, J.S., Duijkeren, E.V., 2009.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 140, 418-429.

**Werckenthin, C., Cardoso, M., Schwarz, S., 2001.** Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Research* 32, 341-362.

## **Z**

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

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

# *Annexes*

## Annexe 1. Données bibliographiques

**Tableau I** Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques (d'après **Baliarda, 2003**) B : bacilles ; C : coques ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	+/-	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO <sub>2</sub>	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
Production d'acide lactique	L	D,L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	+/-

**Tableau II** Exemples d'essais randomisés montrant un effet significatif de bactéries lactiques versus placebo dans la prévention des diarrhées digestives liées à l'antibiothérapie (**Drouault et Corthier, 2001**).

Antibiotique	Bactérie lactique	Effet
Divers	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	5% cas de diarrhée vs. 16%
Divers	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	3,7% cas de diarrhée vs. 13,3%
Erythromycine	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	2 jours de diarrhées vs. 8
Divers	<i>E. faecium</i> SF68 (Bioflorin®)	8,7% cas de diarrhée vs. 27,2%
Néomycine	<i>Lb. acidophilus</i> (Infloran®)	20% cas de diarrhée vs. 42%
Divers	<i>E. faecium</i> SF68 (Bioflorin®)	2,6% cas de diarrhée vs. 14,5%
Ampicilline	<i>Lb. acidophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> (Lactinex®)	8,3% cas de diarrhée vs. 21%



## Annexe 2. Résultats

- **Standardisation des *inocula***

Afin de pouvoir effectuer les antibiogrammes des souches de *S. aureus* ainsi que les tests d'antagonisme, les *inocula* des souches de *S. aureus* et des bactéries lactiques ont été standardisés (**Tableau I**, **Tableau II** et **Tableau III**).

**Tableau I** Résultats du dénombrement des souches de *S. aureus* dans l'eau physiologique

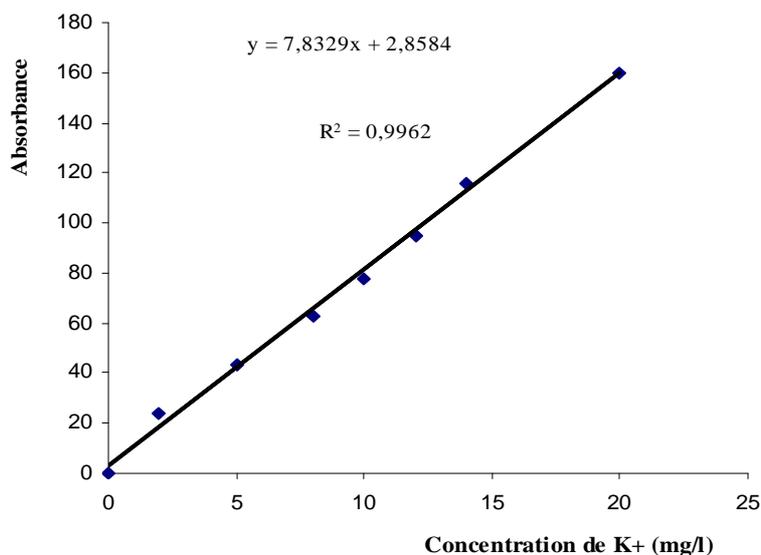
Souches de <i>S. aureus</i>	Nombre de cellules /ml
S <sub>1</sub>	1,2.10 <sup>7</sup>
S <sub>2</sub>	1,7.10 <sup>8</sup>
<b>S<sub>3</sub></b>	<b>1,08.10<sup>8</sup></b>
S <sub>4</sub>	2.10 <sup>8</sup>
S <sub>5</sub>	1,5.10 <sup>7</sup>
L <sub>1</sub>	2,5.10 <sup>8</sup>
L <sub>2</sub>	1,3.10 <sup>8</sup>
L <sub>3</sub>	5.10 <sup>7</sup>
L <sub>4</sub>	2.10 <sup>8</sup>
<b>L<sub>5</sub></b>	<b>2,09.10<sup>8</sup></b>
L <sub>6</sub>	4.10 <sup>7</sup>
L <sub>7</sub>	2,3.10 <sup>8</sup>
L <sub>8</sub>	3.10 <sup>7</sup>
L <sub>9</sub>	2,3.10 <sup>8</sup>
L <sub>10</sub>	2,7.10 <sup>8</sup>

**Tableau II** Résultats du dénombrement des souches de bactéries lactiques dans l'eau physiologique

Bactéries lactique	<i>Lc. lactis</i> (1)	<i>Lc. lactis</i> (2)	<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> (2)	<i>Enterococcus</i> ssp	<i>Lb. paracasei</i>
Nombre de cellules/ml	2,65.10 <sup>9</sup>	1,54.10 <sup>9</sup>	1,96.10 <sup>9</sup>	2,14.10 <sup>9</sup>	1,67.10 <sup>9</sup>	<b>1,7.10<sup>9</sup></b>

**Tableau III** Résultats du dénombrement de *Lb. paracasei* et de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) dans le lait écrémé

Nombre de cellules/ml	<i>Lb. paracasei</i>	<i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> )
	<b>2.10<sup>9</sup></b>	<b>1,5.10<sup>8</sup></b>



**Figure 1** Courbe d'étalonnage du dosage des ions K<sup>+</sup> en spectrophotométrie de flamme

- **Analyse statistique**

Le test effectué dans cette étude statistique est le test *t* de Student de comparaison des moyennes de deux échantillons appariés sous le logiciel STATISTICA 5.5 (Ed. 99).

$P_{obs} > P_{0,05}$  Pas de différence significative

$P_{0,05} > P_{obs} > P_{0,01}$  Différence significative (\*)

$P_{0,01} > P_{obs} > P_{0,001}$  Différence hautement significative (\*\*)

$P_{obs} < P_{0,001}$  Différence très hautement significative (\*\*\*)

**Tableau IV** Comparaison par le test *t* de Student de l'évolution de la concentration des ions K<sup>+</sup> (mg/ml) des surnageants de culture mixte de *Lb. paracasei* et des souches (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) en bouillon BHI

Temps (heures)	<i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i>		<i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i>		P <sub>obs</sub>	Différences
	Moyenne (mg/ml)	Ecart type	Moyenne (mg/ml)	Ecart type		
0	46,2	0,1	46,1	0,6	0,287	Pas de différence significative
1	72,95	0,06	67,84	0,05	0,0000001	***
2	92,1	0,1	83,4	0,26	0,0000001	***
3	98,48	0,17	90,4	0,36	0,0000004	***
4	108	0,2	100	1	0,00017	***

Différence très hautement significative (\*\*\*)

**Tableau V** Analyse statistique (test de Student) de la croissance de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) en culture mixte avec *Lb. paracasei* et en culture pure, dans le lait écrémé

Inoculum de départ : *S. aureus* (L<sub>5</sub>) à 10<sup>6</sup> UFC/ml

*L.b paracasei* à 10<sup>8</sup> UFC/ml

Temps (heures)	<i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ) en culture pure		<i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i>		P <sub>obs</sub>	Différences
	Moyenne (Log UFC/ml)	Ecart type	Moyenne (Log UFC/ml)	Ecart type		
0	6,04	0,12	6,04	0,121	1	Pas de différence significative
2	7,29	0,14	7,05	0,25	0,23	
4	7,85	0,25	7,65	0,18	0,33	
6	8,17	0,20	7,7	0,1	0,023	*
8	8,26	0,11	7,61	0,18	0,006	**
10	8,3	0,12	7,6	0,26	0,013	*
12	8,36	0,09	7,6	0,13	0,0012	**
14	8,5	0,29	7,59	0,20	0,011	*
16	8,65	0,12	7,58	0,051	0,0001	***
18	8,79	0,09	7,58	0,13	0,0002	***
20	8,84	0,096	7,55	0,25	0,0012	**
22	8,9	0,045	7,5	0,10	0,00003	***
24	8,9	0,19	7,4	0,28	0,004	**

Différence significative(\*), Différence hautement significative (\*\*), Différence très hautement significative (\*\*\*)

**Tableau VI** Analyse statistique (test de Student) de la croissance de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) en culture mixte avec *Lb. paracasei* et en culture pure, dans le lait écrémé

Inoculum de départ : *S. aureus* (S<sub>3</sub>) à 10<sup>6</sup> UFC/ml

*L.b paracasei* à 10<sup>8</sup> UFC/ml

Temps (heures)	<i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ) en culture pure		<i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i>		P <sub>obs</sub>	Différences
	Moyenne (Log UFC/ml)	Ecart type	Moyenne (Log UFC/ml)	Ecart type		
0	6,03	0,18	6,03	0,25	1	Pas de différence significative
2	7,6	0,3	7,39	0,11	0,32	
4	8,04	0,10	7,69	0,25	0,094	
6	8,29	0,11	7,7	0,16	0,007	**
8	8,38	0,21	7,69	0,10	0,007	**
10	8,45	0,19	7,68	0,19	0,008	**
12	8,53	0,15	7,68	0,13	0,0018	**
14	8,6	0,18	7,64	0,19	0,003	**
16	8,63	0,21	7,45	0,33	0,006	**
18	8,65	0,22	7,29	0,18	0,0012	**
20	8,66	0,23	7,13	0,12	0,0005	**
22	8,66	0,27	6,9	0,17	0,0006	***
24	8,66	0,045	6,65	0,18	0,00005	***

Différence hautement significative (\*\*), Différence très hautement significative (\*\*\*)

**Tableau VII** Comparaison par le test *t* de Student de l'évolution de la croissance de la souche ( $S_3$ ) et ( $L_5$ ) en culture mixte avec *Lb. paracasei* dans le lait écrémé

Temps (heures)	<i>S. aureus</i> ( $S_3$ ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i>		<i>S. aureus</i> ( $L_5$ ) en culture mixte avec <i>Lb. paracasei</i>		$P_{obs}$	Différences
	Moyenne (Log UFC/ml)	Ecart type	Moyenne (Log UFC/ml)	Ecart type		
0	6,03	0,25	6,04	0,121	0,95	Pas de différence significative
2	7,39	0,11	7,05	0,25	0,1	
4	7,69	0,25	7,65	0,18	0,83	
6	7,7	0,16	7,7	0,1	0,1	
8	7,69	0,10	7,61	0,18	0,5	
10	7,68	0,19	7,6	0,26	0,68	
12	7,68	0,13	7,6	0,13	0,49	
14	7,64	0,19	7,59	0,20	0,76	
16	7,45	0,33	7,58	0,051	0,54	
18	7,29	0,18	7,58	0,13	0,09	
20	7,13	0,12	7,55	0,25	0,06	
22	6,9	0,17	7,5	0,10	0,006	
24	6,65	0,18	7,4	0,28	0,005	**

Différence hautement significative (\*\*)

**Tableau VIII** Comparaison par le test *t* de Student de l'évolution des comptes fécaux de *S. aureus*  $S_3$  (Log UFC/g) des lapins de Lot 1 et 2

Temps (jours)	Lot 1		Lot 2		$P_{obs}$	Différences
	Moyenne (Log UFC/g)	Ecart type	Moyenne (Log UFC/g)	Ecart type		
0	2	0,418	2	0,24	1	Pas de différence significative
1	4,7495	0,64	4,44	0,36	0,43	
2	5,51	0,33	5,36	0,38	0,738	
3	6,72	0,415	6,65875	0,38	0,835	
4	7,5075	0,36	7,36	0,18	0,5	
5	8,2325	0,02	8,2	0,35	0,92	
6	7,535	0,27	7,145	0,29	0,103	
7	7,385	0,38	6,5525	0,13	0,0125	*
8	7,1425	0,30	5,75	0,24	0,003	**
9	6,82	0,30	5,1825	0,21	0,004	**
10	6,45	0,30	4,86	0,30	0,007	**
11	6,25	0,39	4,32	0,33	0,0015	**
12	6,25	0,34	3,92	0,26	0,00041	***

Différence significative(\*), Différence hautement significative (\*\*), Différence très hautement significative (\*\*\*)

- Evolution du pH des cultures pures et mixtes de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>)

**Tableau IX** Evolution du pH de la culture mixte de *S. aureus* (L<sub>5</sub>) avec *Lb. paracasei* et de la culture pure de *S. aureus* (L<sub>5</sub>), dans le lait écrémé

Inoculum de départ : *S. aureus* (L<sub>5</sub>) à 10<sup>6</sup> UFC/ml

*L.b paracasei* à 10<sup>8</sup> UFC/ml

Temps (heures)	pH de la culture pure de <i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> )	pH de la culture mixte de <i>S. aureus</i> (L <sub>5</sub> ) avec <i>Lb. paracasei</i>
0	6,7	6,7
2	6,7	6,56
4	6,62	6,38
6	6,43	6,16
8	6,41	6,01
10	6,31	5,86
12	6,18	5,69
14	6,1	5,58
16	6,08	5,49
18	5,92	5,37
20	5,83	5,22
22	5,71	5,15
24	5,65	4,91

**Tableau X** Evolution du pH de la culture mixte de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) avec *Lb. paracasei* et de la culture pure de *S. aureus* (S<sub>3</sub>), dans le lait écrémé

Inoculum de départ : *S. aureus* (S<sub>3</sub>) à 10<sup>6</sup> UFC

*L.b paracasei* à 10<sup>8</sup> UFC/ml

Temps (heures)	pH de la culture pure de <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> )	pH de la culture mixte de <i>S. aureus</i> (S <sub>3</sub> ) avec <i>Lb. paracasei</i>
0	6,7	6,7
2	6,64	6,42
4	6,6	6,35
6	6,56	6,29
8	6,45	6,13
10	6,39	6,01
12	6,34	5,76
14	6,29	5,7
16	6,24	5,5
18	6,18	5,32
20	6,12	5,1
22	6,1	4,95
24	6,09	4,81

### Annexe 3. Composition des milieux de cultures utilisés

**Tableau I : Gélose et bouillon Chapman**

Composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Peptone	10
Agar	15
D Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
pH7,4	

**Tableau II : Gélose et bouillon nutritif**

Composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	1
Peptone	15
Chlorure de sodium	5
Agar	15
pH7,2	

**Tableau III : Gélose et bouillon BHI**

Composition	Quantité (g/l)
Infusion cœur-cerveille-peptone	27,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2,5
D (+) Glucose	2
Agar	15
pH7,4	

**Tableau IV : Gélose et bouillon MRS**

Composition	Quantité (g/l)
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammonique	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
pH6,5	

**Tableau V : Gélose Mueller Hinton**

Composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	2
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	10
pH7,4	

**Tableau VI : Gélose PCA (Plate Count Agar)**

Composition	Quantité (g/l)
Tryptone	6
extrait de levure	3
Glucose	1
Agar	15
pH7,2	

**Tableau VII : Bouillon Giolitti et Cantoni**

Composition	Quantité (g/l)
Tryptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	5
Chlorure de lithium	5
Mannitol	20
Chlorure de sodium	5
Glycine	1,2
Pyruvate de sodium	3
pH6,9	

**NB.** L'agar n'est ajoutée que dans le cas de milieux gélosés.

**Eau physiologique :**

Eau distillée.....1l  
 Chlorure de sodium.....9g  
 pH 7 et autoclaver à 120°C/20min

## Abstract

In this study, 15 strains of *S. aureus* were isolated from diarrheal stools of patients subjected to antibiotics and milk of cows mastitis. The susceptibility of isolates have permit to select two multiresistants strains, (S<sub>3</sub>) isolated from stool and (L<sub>5</sub>) from milk mastitis. Screening of six (6) strains of lactic acid bacteria against (S<sub>3</sub>) and (L<sub>5</sub>) by the test spots showed that *Lb. paracasei* which is the best testified antibiosis against both *S. aureus*. The *in vitro* study of the antagonism between *Lb. paracasei* against *S. aureus* (S<sub>3</sub>) and (L<sub>5</sub>), has shown a better antibacterial activity of *Lb. paracasei* against the strain (S<sub>3</sub>) compared to the strain (L<sub>5</sub>). Strain (S<sub>3</sub>) was then used for the antibacterial effect *in vivo* on rabbits holoxenic. The antagonistic effect *in vivo* of *Lb. paracasei* against *S. aureus* (S<sub>3</sub>), exhibited to a greater decrease in the number of *S. aureus* (S<sub>3</sub>) in the stools of treated rabbits (Lot 2) compared to those untreated (Lot 1). The histological sections performed on intestinal and colic, showed a restoration of intestinal villus and colonic crypts diarrheal rabbits treated with *Lb. paracasei* compared to control diarrhea (first day of onset of diarrhea) and diarrheal rabbits receiving sterile skim milk. Among these, the villus and crypts appear atrophied and damaged by the action of *S. aureus* (S<sub>3</sub>).

**Keywords:** *Staphylococcus aureus* (MRSA), lactic acid bacteria, *Lb. paracasei*, diarrhea, intestinal atrophy.

## المخلص

في هذه الدراسة تم عزل 15 سلالة من *S. aureus* من براز الإسهال لدي مرضى يتداونون بالمضادات الحيوية و من حليب إلتهاب الأبقار. تجربة الأنتيبيوغرامات علي السلالات المعزولة، أظهرت سلالتا ني تتميزا ني بالمقاومة للمضادات الحيوية و هما : (S<sub>3</sub>) المعزولة من براز الإسهال و (L<sub>5</sub>) المعزولة من حليب إلتهاب ثدي الأبقار. من ضمن ستة بكتيريا الحليب التي أستعملت ضد (S<sub>3</sub>) و (L<sub>5</sub>) ، *Lb. paracasei* هي الأكثر فعالية ضد السلالتاني. التجارب المخبرية لبكتيريا *Lb. paracasei* ضد (S<sub>3</sub>) و (L<sub>5</sub>) ، أظهرت بأن هذه الأخيرة هي أكثر فعالية ضد (S<sub>3</sub>) مقارنة با (L<sub>5</sub>) ، ولذلك (S<sub>3</sub>) هي التي اختيرت للإجراء تجارب على أرانب (holoxéniques). التجارب التي أقيمت على الأرانب باسلالة *Lb. paracasei* ضد (S<sub>3</sub>) ، أظهرت انخفاضا في عدد (S<sub>3</sub>) *S. aureus* في براز الأرانب (Lot 2) المعالجة با *Lb. paracasei* مقارنة بالأرانب الغير معالجة (Lot 1). بعد التشريح أكدت الصور المأخوذة للمقاطع النسيجية أن الزغابات المعوية لدى الأرانب المعالجة با *Lb. paracasei* قد تجددت بالمقارنة مع الأرانب الغير معالجة .

**الكلمات المفتاحية :** *Staphylococcus aureus* (SARM) ، بكتيريا الحليب ، *Lb. paracasei* ، الإسهال ،  
atrophie intestinale

## Résumé

Au cours de cette étude, 15 souches de *S. aureus* ont été isolées à partir de selles de patients diarrhéiques soumis à une antibiothérapie et de lait de vaches mammites. Les antibiogrammes des souches isolées ont permis de sélectionner deux souches multirésistantes, (S<sub>3</sub>) isolée des selles et (L<sub>5</sub>) du lait mammitique. Le criblage de six (6) souches de bactéries lactiques à l'égard des deux souches (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>) par le test des spots, a montré que *Lb. paracasei* est la souche qui a témoigné de la meilleure antibiose envers les deux souches de *S. aureus*. L'étude *in vitro* de l'antagonisme de *Lb. paracasei* vis-à-vis des *S. aureus* (S<sub>3</sub>) et (L<sub>5</sub>), a montré une meilleure activité antibactérienne de *Lb. paracasei* à l'égard de la souche (S<sub>3</sub>) comparée à la souche (L<sub>5</sub>). La souche (S<sub>3</sub>) a été alors retenue pour l'effet antibactérien *in vivo* sur lapins holoxéniques. L'effet antagoniste, *in vivo*, de *Lb. paracasei* envers *S. aureus* (S<sub>3</sub>), a exhibé une plus grande diminution du nombre de *S. aureus* (S<sub>3</sub>) dans les fèces des lapins traités (Lot 2) comparé à ceux non traités (Lot 1). Les coupes histologiques réalisées sur les portions intestinales et coliques, ont montré une restauration des villosités intestinales et des cryptes coliques chez les lapins diarrhéiques traités par *Lb. paracasei* par rapport au témoin diarrhéique (premier jour du déclenchement de la diarrhée) et au lapin diarrhéique non traité recevant le lait écrémé stérile. Chez ces derniers, les villosités et les cryptes apparaissent atrophiées et détériorées par l'action de *S. aureus* (S<sub>3</sub>).

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus* (SARM), bactéries lactiques, *Lb. paracasei*, diarrhée, atrophie intestinale.