

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Microbiologie Appliquée



Réf : .....

Mémoire de fin de cycle

en vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER**

*Thème :*

**Evaluation de l'effet antibactérien d'une  
bactérie lactique *in vivo***

Présenté par :

**BOULZAZEN NABILA et DEHOUCHE MALIA**

*Soutenu le : 23/09/2021*

**Devant le jury composé de :**

Mme. Bendali F.	Professeur	Présidente
Mme. Benachour K.	MAA	Encadreur
M. Bendjeddou K.	MCB	Examineur

**2020/2021**

# *Remerciements*

*Avant tout propos, remerciements et louanges à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la volonté et la santé pour finaliser ce modeste travail et le présenter.*

*Le présent mémoire n'aurait pu voir le jour sans la contribution de nombreuses personnes.*

*Aussi, nous tenons à remercier très chaleureusement notre promotrice Mme Benachour K. pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien.*

*Nos remerciements les plus sincères vont à Mme Bendali F. qui nous fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer notre travail.*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement Mr Bendjeddou K. d'avoir accepté et consacré du temps pour examiner notre travail.*

*Un remerciement spécial s'adresse aux techniciennes du Laboratoire de Microbiologie.*

*Nous tenons aussi à remercier infiniment Dr H. Sklab spécialiste en anatomie pathologie.*

*Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

**BOULZAZEN Nabila et DEHOUCHE Malia**

# Dédicaces

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail :*

- *À mes très chers parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée et qui ont mis tous les moyens à ma disposition pour réussir.*
- *À mon défunt grand-père **Ahmed** (que Dieu lui accorde sa miséricorde) qui m'a toujours encouragée à enrichir mes connaissances et à aller de l'avant.*
- *À la mémoire de ma grand-mère **Zouina** (que Dieu lui accorde sa miséricorde).*
- *À mes très chers grands-parents **Abdelkader** et **Aïcha**.*
- *À mes frères et sœur **Idir**, **Adel** et **Wissam**.*
- *À toute ma famille, en particulier mon oncle **Abdelatif** et ma tante **Khoukha**, pour leur aide.*
- *À ma meilleure amie **Massilia** qui m'a toujours soutenue.*
- *À tous mes amis en particulier **Samy**, **Louanes** et **Yasmine**.*
- *À ma binôme **Malia** avec qui j'ai partagé ce travail.*
- *À tous ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin.*

**N. BOULZAZEN**

# *Dédicaces*

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots que je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers,*

- *À mes parents, source de vie, d'amour et d'affection.*
- *À ma sœur, source de joie et de bonheur.*
- *À ma tante que je considère comme une deuxième mère.*
- *À toute ma famille, source d'espoir et de motivation et plus particulièrement à mon défunt grand-père qui m'a toujours encouragée à enrichir mon « savoir » et à ma défunte grand-mère que Dieu l'accueil dans son vaste paradis.*
- *À toutes mes cousines.*
- *À tous mes amis.*
- *À ma binôme et à vous chers lecteurs.*

**M. DEHOUCHE**

# Sommaire

<b>Introduction :</b> .....	<b>01</b>
-----------------------------	-----------

## **Partie 01 : Synthèse bibliographique**

<b>I. Bactéries lactiques</b> .....	<b>02</b>
I.1. Historique .....	02
I.2. Caractéristiques générales.....	02
I.3. Ecologie et habitat .....	04
I.4. Classification .....	04
I.5. Genre <i>Lactobacillus</i> .....	04
<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	06
I.6. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	07
I.6.1. pH et les acides organiques.....	07
I.6.2. Peroxyde d'hydrogène.....	07
I.6.3. Diacétyl.....	08
I.6.4. Dioxyde de carbone.....	08
I.6.5. Reutéline.....	08
I.6.6. Bactériocines.....	08

## **Partie 02 : Partie pratique**

<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	<b>10</b>
I.1. Origine des souches.....	10
I.2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes.....	10
I.3. Standardisation des souches bactériennes.....	10
I.4. Etude de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> .....	11
Méthode directe (Test des spots) .....	11
I.5. Étude <i>in vivo</i> de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus plantarum</i> XS à l'égard de <i>S.aureus</i> chez des rats holoxéniques.....	12
I.5.1. Provocation de la diarrhée par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
I.5.2. Traitement.....	14

I.5.3. Dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
I.5.4. Dissection des rats.....	14
I.5.5. Réalisation des coupes histologiques.....	14
I.5.5.1. Préparation des cassettes.....	15
I.5.5.2. Étape de circulation.....	15
I.5.5.3. Enrobage.....	15
I.5.5.4. Coupage.....	16
I.5.5.5. Étalement des coupes.....	16
I.5.5.6. Déparaffinage.....	16
I.5.5.7. Coloration des lames à l'Hématoxyline de Harris-Éosine.....	16
I.5.5.8. Montage des lames.....	16
I.6. Observation microscopique.....	16

### **Partie 03 : Résultats et discussion**

<b>I. Résultats et discussion.....</b>	<b>18</b>
I.1. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes.....	18
I.2. Résultats de la standardisation des souches test (bactéries lactiques).....	19
I.3. Etude de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> .....	19
Méthodes directes (Test des spots).....	19
I.4. Étude <i>in vivo</i> de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus plantarum</i> XS à l'égard de <i>S.aureus</i> chez des rats holoxéniques.....	21
I.4.1. Dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
I.4.2. Coupes histologiques.....	22
Conclusion.....	24
Références bibliographiques	

Annexes

*Liste des tableaux*

**Tableau I** : Étape de la circulation.....15

**Tableau II** : Étapes de coloration histologique.....17

## *Liste des figures*

<b>Figure 01:</b> Schéma illustrant les étapes du test des spots.....	12
<b>Figure 02:</b> Illustration d'un rat dans sa cage (A) et de l'aliment utilisé (B).....	13
<b>Figure 03 :</b> Aspect de <i>Lactobacillus plantarum</i> XS sur gélose MRS (A) et <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Chapman (B).....	17
<b>Figure 04 :</b> Observation microscopique de <i>Lactobacillus plantarum</i> XS (A) et <i>Staphylococcus aureus</i> (B) sous microscope optique (G×100) après coloration de Gram .....	18
<b>Figure 05:</b> Exemples de résultats obtenus par le test de spots à l'égard de <i>S. aureus</i> .....	19
<b>Figure 06:</b> Dénombrement de <i>S. aureus</i> pendant la période de l'expérimentation animale...20	
<b>Figure 07:</b> Observations microscopiques des coupes réalisées sur l'intestin grêle .....	22

## *Liste des abréviations*

**MRS** : De Man, Rogosa et Sharpe

**pH** : Potentiel d'hydrogène

*S.* : *Staphylococcus*

**BHIB** : Brain Heart Infusion Broth

**UHT** : Ultra Haute Température.

**MH** : Muller Hinton.

**VRBG** : Violet Red Bile Glucose.

**UFC** : Unité formant colonies

# *Introduction*

De nombreux micro-organismes cohabitent depuis toujours avec l'Homme, et ce dernier les utilise depuis longtemps. Depuis leur découverte par Pasteur, l'Homme a appris à contrôler les micro-organismes pathogènes et à utiliser de manière rationnelle ceux qui pouvaient lui être utiles tels que les bactéries lactiques, en tant que probiotiques, pour faire face aux infections microbiennes (**Hassaine, 2013**).

Les bactéries lactiques représentent un groupe diversifié de bactéries produisant de l'acide lactique comme élément essentiel du métabolisme. La diversité et la densité de ces bactéries leur permet d'être utilisées dans de nombreux produits alimentaires fermentés en tant que starter. Elles sont notamment connues pour leur aptitude à inhiber la croissance de germes pathogènes grâce à la production de nombreux métabolites qui ont un effet antibactérien tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thaonart, 2009**), et les études de (**Makras et al., 2006**) ont déjà confirmé l'activité antagoniste des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes comme la *Salmonella*, le *Staphylococcus aureus* et le *E. Coli*.

Nous retrouvons dans cette multitude de micro-organismes des probiotiques qui sont définis comme étant « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**). Parmi eux, figure *Lactobacillus plantarum* qui joue un rôle de protecteur de l'intestin contre les infections grâce à la production de protéines extracellulaires, d'exopolysaccharides, de bactériocines et d'acides lipotéichoïques. Cette espèce est aussi capable de résister et de se développer dans des conditions difficiles du tractus gastro-intestinal en interagissant avec les cellules épithéliales et renforce ainsi le système immunitaire.

De nombreux travaux ont démontré l'efficacité de *Lactobacillus plantarum* pour lutter contre de multiples infections microbiennes, et les molécules antibactériennes qu'elle produit sont considérées comme responsables de l'activité antagoniste dont le spectre d'activité est large ou étroit selon plusieurs critères reliés à la souche cible comme la sensibilité et la nature du produit antibactérien (**Grosu-Tudor et al., 2014**)

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet antibactérien de la souche *Lactobacillus plantarum* XS *in vivo* vis-à-vis d'une souche pathogène *Staphylococcus aureus*.

*Synthèse*  
*bibliographique*

## **I. Bactéries lactiques :**

### **1. Historique :**

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes apparus avant les cyanobactéries photosynthétiques (**Quiberoni et al., 2001 ; Drider et Prevost, 2009**). Ils sont découverts dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (**Tailliez, 2001**)

En 1873, dix ans après que Louis Pasteur ait étudié la fermentation lactique, Lister a obtenu la première culture pure d'une bactérie lactique (LAB) « *Bacterium lactis* » (actuellement connue sous le nom *Lactococcus lactis*). Des cultures de starter pour la production de fromage et de lait aigre ont été introduites en 1890, tandis que les aliments fermentés ont été utilisés par l'Homme pour plus de 5000 ans (**Schlegel, 1999 ; Stiles et Holzappel, 1997**).

Le terme bactéries lactiques (Lactic acid bacteria: LAB) a été utilisé pour signifier les organismes du lait acidifié (Milk-souringorganisms) (**Axelsson, 2004**).

### **2. Caractéristiques générales :**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**de Roissart, 1986**). Elles ont pour principales caractéristiques d'être : à Gram positif, généralement non mobiles, asporulées, sphériques ou en forme de bâtonnet, anaérobies mais aérotolérantes (**Larpen, 1989**), ne possèdent ni catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), ni nitrate-réductase, ni cytochrome oxydase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas l'indole, ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles sont strictement fermentatives et 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 ; Hogg, 2005**). Ces bactéries sont essentiellement cultivées dans le milieu de Man Rogosa et Sharpe (MRS) (**Guiraud et Rosec, 2004**).

Du point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques appartiennent à la branche clostridiale, avec un G+C% inférieur à 55% (**Raynaud, 2006**).

Elles ont la capacité de fermenter les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) en acide lactique (**Kandler et Weiss, 1986**). Deux voies métaboliques du glucose ont été observées chez le LAB. D'une part, une voie homofermentaire, à travers laquelle ces bactéries catabolisent le glucose par glycolyse et produisent principalement de l'acide lactique. D'autre part, lorsque le glucose est catabolisé par la voie de la phosphocétolase chez les organismes hétérofermentaires, et il en résulte des quantités équimolaires d'acide lactique, d'éthanol et de CO<sub>2</sub> (**Thornhill et Cogan, 1984; Makarova et al., 2006**).

Enfin, les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (**Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993**). Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* et certaines de *Lactobacillus* sont néanmoins considérées comme des pathogènes opportunistes provoquant des maladies (**Aguirre et Collins, 1993 ; König et Fröhlich, 2009**).

### **3. Ecologie et habitat :**

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou associées aux habitats riches en nutriments, comme divers produits alimentaires (lait, viandes, boissons, végétaux) mais d'autres sont aussi membres de la flore normale de la bouche ; l'intestin et le vagin des mammifères (**Klein et al., 1998 ; Douault et Corthier, 2000 ; Salminen, 2004 ; Carina Audisio et al., 2010**).

Elles ont été, également, retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égouts (**Holzappel et al., 1996 ; Cité par Givry, 2006**). Elles constituent aussi la flore microbienne dominante responsable de la fermentation des céréales et des plantes fourragères ensilées (**Carr et al., 2002**).

#### **4. Classification :**

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique et biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des micro-organismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les sucres, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, synthétiser certaines enzymes tels que lipase, lactase et estérase (**Mofredj et al., 2007**).

La monographie d'Orla-Jensen (1919) constitue la référence pour l'étude des bactéries lactiques. Orla-Jensen utilise les caractéristiques suivantes : morphologie (Cocci ou bâtonnet ; formation tétrade) ; mode de fermentation du glucose (Homo ou hétérofermentation), la croissance à certaines températures cardinales exemple (10°C et 45°C), les types de sucres utilisés ; comme base de classification (**Stiles et Holzapfel, 1997 ; Carr et al., 2002 ; Axelsson, 2004**).

La composition en GC de l'ADN et la composition en acides gras, sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007**).

Le genre *Lactobacillus* comprend 261 espèces (mars 2020) qui sont extrêmement diverses au niveau phénotypique, écologique et génotypique. Cette étude a évalué la taxonomie des *Lactobacillaceae* et des *Leuconostocaceae* sur la base des séquences du génome.

Ces révisions taxonomiques récentes ont proposé 25 nouveaux genres (**Zheng et al., 2020**).

#### **5. Genre *Lactobacillus* :**

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique, intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrés comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développant à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en : acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et minéraux (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**).

Ils sont strictement fermentatifs, aéro-tolérants mais se développent bien dans des conditions anaérobies. Ils préfèrent des conditions acides relatives (pH 5,5 à 6,5) (**Mattarelli et Halzapfel, et al., 2014**).

Le genre *Lactobacillus* a été divisé dès 1919 par Orla-Jensen en trois sous-genres à base des critères de température optimale de croissance et de produits de la fermentation des sucres. Cette subdivision a été confirmée par les travaux de **Buyze et al.(1957)**. Néanmoins, les travaux de taxonomie moléculaire ont incité **Kandler et Weiss (1986)** à abandonner la classification en sous-genres tout en maintenant la subdivision en trois groupes désignés par des numéros :

- Groupe I (***Thermobacterium***): formé de Lactobacilles homofermentaires stricts qui fermentent les hexoses, par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant presque exclusivement du lactate, mais ne fermentent ni les pentoses, ni le gluconate. Ce qui fait que les espèces de ce groupe sont les plus acidifiantes (2,7% d'acide lactique) et sont également les plus thermophiles (température maximale de croissance varie de 40 à 52°C).
- Groupe II ( ***Streptobacterium***): formé de Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, mésophiles qui fermentent les hexoses, par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant presque exclusivement du lactate (ou ,tout au moins pour certaines souches : du lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du formiate, en présence de quantités limitantes de glucose) et peuvent fermenter les pentoses en lactate et acétate par une phosphokétolase inductible.
- Groupe III ( ***Bétabacterium***): formé de Lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol ) et CO<sub>2</sub> et qui fermentent les pentoses en lactate et acétate en faisant appel dans les deux cas à une phosphokétolase. Les espèces de ce groupe se caractérisent par leur faible capacité acidifiante (0,5 % d'acide lactique). Ce groupe inclut aussi certaines souches qui semblent suivre une autre voie hétérofermentaire (**Mattarelli et Halzapfel, et al., 2014**).

- ***Lactobacillus plantarum*** :

*Lactobacillus plantarum* est une bactérie non mobile, asporulée et microaérophile. Ces cellules se présentent sous forme de bâtonnets droits avec des extrémités arrondies, vivant seules, ou regroupées en paires, ou en chainettes, une pseudocatalase a été retrouvée chez quelques souches de *Lb. plantarum* (Corsetti et Valmorri, 2011). *Lb. plantarum* est une espèce mésophile présentant une croissance à 10 °C. Elle possède une tolérance élevée à des valeurs de pH faibles qui peuvent atteindre 3,2 (Kleerebezem et al., 2003).

Il se retrouve dans différentes niches écologiques ; les produits laitiers (Agaliya et al., 2012 ; Chang et al., 2016), les légumes (Bringel et al., 2005), les voies gastro-intestinales, vaginales et urogénitales (Wang et al., 2011; AlKassaa et al., 2014). *Lactobacillus plantarum* est considérée comme un micro-organisme très utilisé dans le domaine alimentaire (Mogensen et al., 2002).

*Lactobacillus plantarum* est l'une des espèces les plus répandues dans la nature et les plus polyvalentes. Elle est utilisée comme probiotique et ferment lactique d'importance industrielle, et qui peut être trouvée dans les aliments fermentés (Siezen et al., 2011), ainsi que dans les aliments probiotiques, fonctionnels et thérapeutiques (De Vries et al., 2006).

C'est un bacille Gram positif, hétérofermentaire facultatif, qui a d'abord été appelé *Streptobacterium plantarum* par Orla-Jensen en 1919 puis renommé *Lactobacillus plantarum* par Pederson en 1936 (Melgar-Lalane, 2012).

Cette espèce se trouve également dans le microbiote intestinal chez l'Homme et les animaux et contribue à la fermentation de nombreux aliments. Elle est d'origine végétale (d'où l'appellation « *plantarum* »).

*Lb. plantarum* fermente généralement les hexoses par la voie métabolique Embden-Meyerhof-Parnas entraînant la formation d'acide lactique. De plus, les pentoses sont fermentés pour former l'acide lactique et l'acide acétique (Todorov et al., 2010).

*Lb. plantarum* a montré des réponses différentes à plusieurs facteurs de stress : résistance à une température élevée de 55 °C pendant 10 min, bile (0,5%), stress oxydatif (0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pH bas (2,5), éthanol (10%), NaCl (7,5%) et a même montré une tolérance à un détergent : le SDS (dodécylsulfate de sodium à 0,05%) (Parente et al., 2010).

## **6. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques, utilisées habituellement en tant que ferments ou non ferments pour développer certaines caractéristiques organoleptiques, peuvent également avoir un rôle comme agents de conservation des aliments. Leur pouvoir antimicrobien peut être attribué à divers facteurs :

- Compétition nutritionnelle et spatiale.
- Production d'un ensemble de métabolites possédant des propriétés antimicrobiennes.

Ces métabolites sont des acides organiques (principalement l'acide lactique), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle (2,3-butanedione) et les bactériocines (**Ammor et al., 2006 ; Dalié et al., 2010**).

### **6.1. pH et les acides organiques :**

Les acides organiques sont les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques. Ils sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe (**Liu, 2003**).

Cependant les bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés «acid tolerance response» vis-à-vis de l'exposition à des pH acides. Ceux-ci leur sont également utiles pour survivre au transit intestinal (**Brul et Coote, 1999 ; Cotter et Hill, 2013**).

### **6.2. Peroxyde d'hydrogène :**

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique qui peut dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Zalan et al., 2005**).

Il existe des bactéries lactiques qui peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de pseudocatalase (**Strus et al., 2005**).

L'action du peroxyde d'hydrogène se manifesterait aussi bien sur les bactéries pathogènes que sur les bactéries lactiques. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé Humaine (**Zalan et al., 2005**).

### **6.3. Diacétyl :**

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Lactobacillus sp* et *Pediococcus sp*. Le diacétyl a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatifs et les bactéries Gram positifs non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (**El Ziney et al., 1998**).

### **6.4. Dioxyde de carbone :**

Il est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les micro-organismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Ammor et al., 2006**).

### **6.5. Reutéline :**

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* (**El Ziney et al., 1998**). La reutéline s'accumule alors dans le micro-organisme producteur. À haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (**Vollenweider, 2004**).

### **6.6. Bactériocines :**

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Les plus connues sont: la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les bactériocines possèdent des effets bactéricides ou bactériostatiques sur les cellules sensibles (**An et al., 2017; Kaktcham et al., 2019**), au cours desquels les bactéries meurent tout en gardant leur intégrité physique (pas de lyse cellulaire) et un effet bactériolytique qui conduit à une dissolution de la cellule bactérienne (**Makhloufi, 2011**).

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**De vuyst et Vandamme, 1994; Kumari et al., 2009**).

## *Synthèse bibliographique*

Le mécanisme d'action des bactériocines se décompose en trois étapes : la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible ; l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique avec recrutement de plusieurs peptides antibactériens afin de former un pore et enfin, la formation de pores conduisant aux fuites de composés intracellulaires vitaux. Cette perte entraîne des effets néfastes pour la cellule cible, allant jusqu'à la mort cellulaire (**Jasniewski, 2008**).

La production de bactériocine offre de nombreux avantages, l'augmentation de la compétition avec la microflore résidente provoque l'inhibition de croissance des bactéries pathogènes (**Holzapel et Schillinger, 2002**).

# *Matériel et méthodes*

## **I. Matériel est méthodes :**

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie 1 de l'université de Béjaïa pendant une durée allant du mois de mai au 15/07/2021.

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'activité antibactérienne d'une souche lactique *Lb.plantarum* XS à l'égard de *S.aureus* SARM, *in vivo*.

### **1. Origine des souches :**

Deux souches bactériennes ont été utilisées dans cette étude, un *Lactobacillus plantarum* XS isolé de la cavité buccale, caractérisé précédemment et conservé à 4°C dans du bouillon MRS (pronadisa, Espagne). Une souche de bactéries pathogènes appartenant à *Staphylococcus aureus*, résistante à la méthiciline (SARM), isolée à partir des selles d'un enfant et conservée à 4°C dans du bouillon BHI (pronadisa, Espagne).

### **2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes :**

Il est obligatoire de vérifier la pureté des souches avant toute utilisation. Après des repiquages successifs sur les milieux appropriés à chaque souche, des tests sont réalisés pour vérifier la pureté des deux souches. Ils se résument dans :

- L'observation macroscopique de l'aspect des colonies.
- La coloration de Gram.
- Test de catalase.

### **3. Standardisation des souches bactériennes :**

A partir des cultures fraîches obtenues après 18h d'incubation dans du bouillon MRS pour *Lactobacillus plantarum* XS et le bouillon BHIB pour la souche de *Staphylococcus aureus*, un ensemencement en stries est effectué sur gélose MRS (bactéries lactiques) et gélose nutritive (bactéries pathogènes) puis incubé à 37°C pendant 24h. Après croissance, 4 colonies de la souche lactique et 2 colonies de 2 mm de diamètre des souches pathogènes sont mises respectivement dans 9 ml de bouillon MRS et dans 9 ml du milieu BHIB, par la suite incubé à 37°C pendant 24h. A partir des cultures obtenues, des séries de dilution décimale sont réalisées dans de l'eau physiologique suivie d'ensemencement en masse des dilutions  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  à raison de deux boîtes pour chaque dilution. Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 24h. Un dénombrement est réalisé après croissance bactérienne et la concentration cellulaire est exprimée en UFC/ml, suivant la formule (**Norme ISO 7218- mai 1996**)

$$N = \frac{\sum c}{v(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$\Sigma C$  : est la somme des colonies comptées sur les boites retenues (30 à 300).

$n_1$  : est le nombre de boites comptées à la dilution la plus faible.

$n_2$  : est le nombre de boites comptées à la dilution la plus élevée.

$d$  : est la valeur correspondante à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus.

$N$  : la concentration cellulaire exprimée en UFC/ml Unité formant colonie.

$V$  : volume de l'inoculum appliqué à chaque boite en millilitre (1ml).

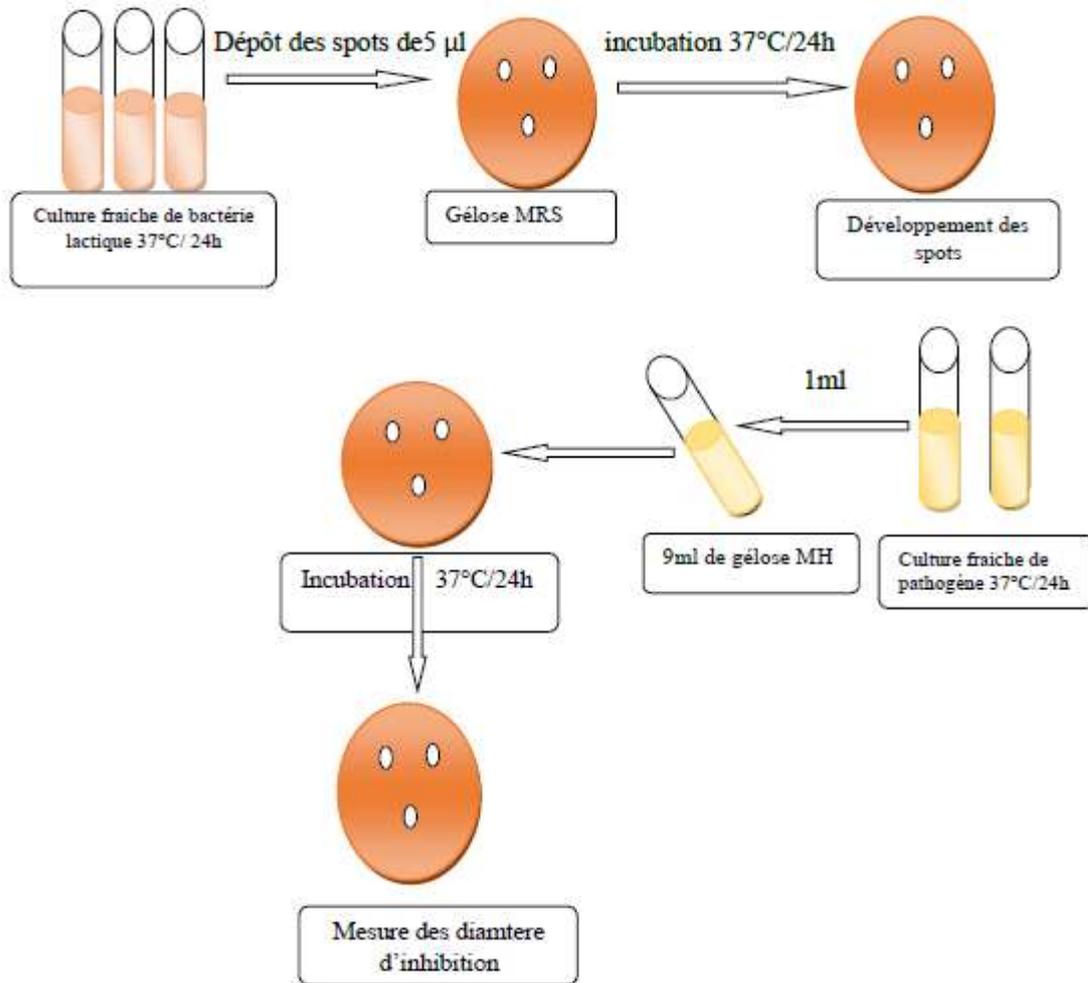
#### 4. Etude de l'activité antibactérienne *in vitro* :

- **Méthode directe (Test des spots) :**

Dans le but de tester l'activité antimicrobienne de *Lactobacillus plantarum* XS à l'égard de *S.aureus*, le test des spots est réalisé.

Ce test consiste à déposer un volume de 5 $\mu$ l de la culture fraîche de 24h de *Lactobacillus plantarum* XS d'une concentration de 10<sup>9</sup> UFC/ml sur une gélose MRS (solidifiée et séchée), les spots sont séchés près du bec bunsen pendant quelques minutes puis incubés à 37°C pendant 24h. En parallèle, une culture fraîche de *S.aureus* à tester est préparée en la cultivant dans 9ml du BHIB et incubée à 37°C /24h (Figure 01).

Après incubation, 9ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont inoculés par 1ml (10<sup>7</sup>UFC/ml) de la souche cible. Ensuite, le mélange est coulé sur la gélose MRS, en contact avec les spots. Les boites sont incubées à 37°C/24h (**Fleming et al., 1975**). Au terme de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.



**Figure 01 : Schéma illustrant les étapes du test des spots**

**5. Étude *in vivo* de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* XS à l'égard de *S. aureus* chez des rats holoxéniques :**

L'étude a porté sur 12 rats holoxéniques albinos, de sexe masculin âgés de 40 jours, d'un poids d'environ 100 g. Ces rats sont répartis en quatre lots de trois rats chacun : lot témoin, lot infecté, lot infecté traité, lot gavé seulement avec *Lactobacillus plantarum* XS. Chaque lot est placé dans une cage (Figure 02). Ils ont été logés à une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  avec un cycle de lumière/obscurité de 12 h. L'accès à la nourriture (aliment ONAB) et à l'eau est libre.



**A: Rat Wistar.**



**B: Aliment des rats (granules).**

**Figure 2: Illustration d'un rat dans sa cage (A) et de l'aliment utilisé (B)**

Ce modèle animal a été d'abord installé 10 jours avant, dans le milieu qui lui était réservé, pour éviter toute instabilité de leur microflore intestinale qui serait due au stress ou au régime d'expérimentation. Pour estimer le nombre de *S. aureus* dans la flore fécale, un dénombrement a été effectué sur gélose Chapman (pronadisa, Espagne). La durée de l'expérimentation est de 22 jours, dix jours pour la phase d'adaptation des rats et 12 jours pour l'expérimentation elle-même.

### **5.1. Provocation de la diarrhée par *Staphylococcus aureus* :**

La provocation de diarrhée est effectuée par l'administration aux rats du lot infecté et infecté traité, par voie de gavage d'une dose journalière de 2 ml du lait écrémé contenant  $2,14 \times 10^7$  UFC/ml de *Staphylococcus aureus*. Ce « préferment » est réalisé pendant toute la période de contamination, et cela en ensemençant deux colonies de *Staphylococcus aureus* d'une culture fraîche dans 9 ml du lait écrémé. Une concentration cellulaire de  $2,1 \times 10^8$  UFC/ml est obtenue après incubation à 37°C /24h. Une dilution décimale est réalisée dans 9 ml du lait écrémé stérile pour obtenir un lait écrémé renfermant  $2,14 \times 10^7$  UFC/ml et qui sera gavé aux rats.

## **5.2. Traitement :**

Juste après apparition de la diarrhée, les rats sont traités comme suit :

- **Lot témoin :** Les rats reçoivent 2 ml de lait écrémé stérile.
- **Lot infecté :** Les rats reçoivent 2 ml de lait écrémé stérile.
- **Lot infecté, traité :** Les rats reçoivent 2 ml de lait écrémé contenant  $1, 3 \times 10^8$  UFC /ml de *Lactobacillus plantarum XS* qui est préparé par ensemencement de quatre colonies d'une culture fraîche de 24h de cette bactérie dans 9 ml du lait écrémé. Une dilution décimale est réalisée dans 9 ml du lait écrémé stérile pour obtenir une concentration cellulaire de l'ordre de  $10^8$  UFC/ml et qui sera administrée aux rats.

Ce traitement est suivi jusqu' à disparition complète de l'état diarrhéique.

Le quatrième lot est gavé seulement par *Lactobacillus plantarum XS*.

## **5.3. Dénombrement de *Staphylococcus aureus* :**

Les selles des rats sont récupérées chaque deux jours, directement dans des tubes stériles, en les rapprochant de l'anus de l'animal. Le dénombrement de *Staphylococcus aureus* est effectué pendant toute la période de l'expérimentation animale, et il est réalisé comme suit : 1 g de selles prélevées est dissout dans 9 ml d'eau physiologique (dilution 10-1). À partir de cette dernière, des dilutions décimales sont réalisées. Pour chaque dilution, 1 ml est ensemencé en masse sur gélose Chapman et incubé à 37°C/24h. Après incubation, un dénombrement est réalisé.

## **5.4. Dissection des rats :**

Le but de la dissection est d'observer et de comparer la structure des villosités intestinales et des cryptes du colon des rats des différents lots pour évaluer l'effet de *Staphylococcus aureus* et de *Lactobacillus plantarum XS* sur le traitement de la diarrhée. La dissection est effectuée à différentes étapes de l'expérimentation animale.

## **5.5. Réalisation des coupes histologiques :**

Les coupes histologiques des portions intestinales et coliques des rats disséqués sont réalisées au niveau du laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques esclab Béjaia , selon la méthode de Hould (1984) modifiée.

**5.5.1. Préparation des cassettes :**

Les portions d'intestin grêle et de côlon de chaque rat sont coupées sous forme d'un ruban fin de 15 à 20 mm de longueur et de 5 à 7 mm de largeur qui seront déposés dans des cassettes. Les cassettes sont imprégnées dans un bac de formol pendant 24 h (post fixation).

**5.5.2. Étape de circulation :**

Elle est constituée de 3 sous-étapes : déshydratation, éclaircissement et imprégnation. Les étapes de la circulation sont résumées dans le tableau I.

**Tableau I : Étape de la circulation**

<b>Étape</b>	<b>Durée</b>
<b>Déshydratation</b> Ethanol (70%) 1 <sup>er</sup> bain Ethanol (80%) 2 <sup>ème</sup> bain Ethanol (90%) 3 <sup>ème</sup> bain Ethanol (96%) 4 <sup>ème</sup> bain Acétone un seul bain	<b>30 mn</b> <b>30 mn</b> <b>1h</b> <b>1h</b> <b>1h</b>
<b>Eclaircissement</b> Xylène 1 <sup>er</sup> bain Xylène 2 <sup>ème</sup> bain	<b>30 mn</b> <b>1h</b>
<b>Imprégnation</b> Paraffine 1 <sup>er</sup> bain Paraffine 2 <sup>ème</sup> bain	<b>30 mn</b> <b>1h</b>

**5.5.3. Enrobage :**

Les segments sont enrobés dans des blocs de paraffine fondue au préalable pour pouvoir couper au microtome. Les blocs obtenus sont mis à 4 °C pour une meilleure solidification.

**5.5.4. Coupage :**

Les coupes histologiques sont réalisées au microtome en une épaisseur de 5 µm.

**5.5.5. Étalement des coupes :**

Les coupes obtenues sont étalées délicatement sur la surface des lames. Les lames sont ensuite séchées sur une plaque chauffante à 60 °C, puis à l'air.

**5.5.6. Déparaffinage :**

Les lames sont placées sur une plaque chauffante à 60 °C pendant 30 mn, puis trempées dans deux bains de xylène pendant 15 mn chacun.

**5.5.7. Coloration des lames à l'Hématoxyline de Harris-Éosine :**

On peut avoir recours à différents colorants afin de distinguer les différents tissus. La coloration, « hématoxyline-Éosine » permet une coloration bleue du noyau et rose du cytoplasme (Welsh, 2000). Le procédé de coloration histologique est représenté dans le tableau II.

**5.5.8. Montage des lames :**

Il s'agit de recouvrir avec quelques gouttes d'Eukitt l'étalement entre lames et lamelles. Le but du montage est multiple ; il permet de protéger mécaniquement l'étalement et la conservation de l'éclat des colorations.

**6. Observation microscopique :**

L'observation microscopique des lames se fait à l'aide d'un microscope optique (grossissement x10).

**Tableau II:** Étapes de coloration histologique.

<b>Étape</b>	<b>Durée</b>
Ethanol 96 %	2 mn
Ethanol 96 %	2 mn
Réhydratation	5-10 mn
<b>Première coloration : Hématoxyline de Harris</b>	10 mn
Rinçage à l'eau	Passage
Bain d'alcool acidifié (1/4 L d'eau + 5 gouttes HCl)	2 plongées
Bain d'eau	2 plongées
Bain d'eau ammoniacale	2 plongées
Bain d'eau	2 mn
<b>Deuxième coloration : Eosine</b>	10 plongées
Bain d'eau	1 plongée

## *Résultats et discussion*

## II. Résultats et discussion :

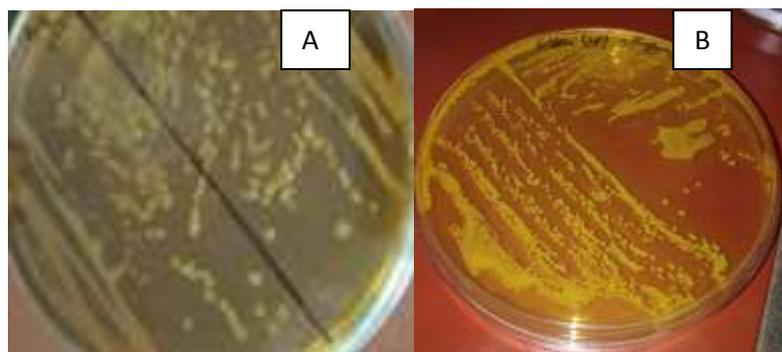
### 1. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes :

L'apparition de trouble dans les tubes ensemencés de *Lactobacillus plantarum* XS signifie la croissance des souches sur le bouillon MRS, dont le fond des tubes est plus dense en raison de recherche des conditions d'anaérobiose, et cela confirme la viabilité des bactéries en comparaison avec le tube témoin (absence de croissance). La croissance des souches de *Staphylococcus aureus* se manifeste par la présence de trouble dans les tubes de BHIB ensemencés.

Les résultats de la caractérisation macroscopique et microscopique, ont indiqué que toutes les souches utilisées sont pures et ne présentent pas de contaminations.

L'examen macroscopique consiste en une observation directe à l'œil nu, des colonies obtenues sur gélose pour caractériser leur forme, couleur, taille et leur aspect (**Badis et al., 2005**). Les colonies des souches *Lactobacillus plantarum* XS obtenues sur gélose MRS, sont apparues de petite taille, lisses, de couleur blanchâtre et crémeuse, bombées (allongées ou à bords arrondis ou lenticulaires) (**Figure 03**).

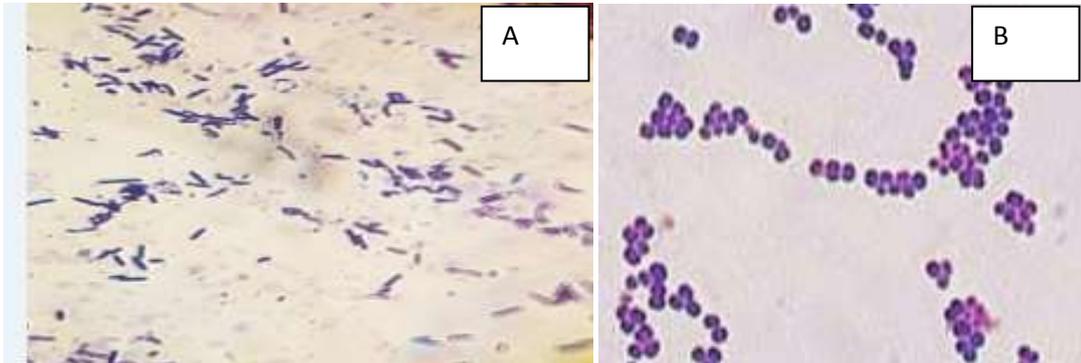
Sur milieu Chapman, la croissance de *Staphylococcus aureus* apparait sous forme de colonies jaune doré et changement de la couleur du milieu qui est dû à la dégradation des sucres.



**Figure 03 :** Aspect de *Lactobacillus plantarum* XS sur gélose MRS (A) et *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman (B)

Les résultats du test de catalase révèlent une absence d'effervescence chez la bactérie lactique utilisée, ce qui signifie qu'elle est catalase négative. Présence d'effervescence chez la souche de *Staphylococcus aureus*, ce qui signifie qu'elle est catalase positive.

Les observations microscopiques réalisées nous ont révélé que toutes les souches sont Gram positifs (couleur violet), et nous ont permis, d'autre part, de distinguer la morphologie de *Lactobacillus plantarum* qui se présente sous forme de bacilles plus ou moins longues, ces formes sont disposées en paires, en chaînes de différentes longueurs ou en singulier simple (Figure 08). Cependant *Staphylococcus aureus* est présenté sous forme des cocci disposés en amas, en grappe de raisin et sont à Gram positifs (Figure 04).



**Figure 04** : Observation microscopique de *Lactobacillus plantarum* XS (A) et *Staphylococcus aureus* (B) sous microscope optique (G×100) après coloration de Gram.

### 2. Résultats de la standardisation des souches test (bactéries lactiques) :

Les résultats de la standardisation de l'inoculum de *Lactobacillus plantarum* XS ont montré que 4 colonies prélevées sur gélose MRS, puis ensemencées sur bouillon MRS, ensuite incubées à 37°C/24h à 48h, donnent un inoculum de  $2,65 \times 10^9$  UFC/ml.

Les résultats rapportés par **Bekka** et **Benmaouche** en 2017, dans leur travail, où 4 colonies ont servi pour la standardisation des bactéries lactiques dans MRS, ont abouti à des résultats proches de nos résultats où la concentration cellulaire varie entre  $10^8$  et  $10^9$  UFC/ml.

Cependant *Staphylococcus aureus* donne une concentration de  $3 \times 10^8$  UFC/ml en utilisant deux colonies de 2mm de diamètre.

### 3. Etude de l'activité antibactérienne *in vitro* :

- **Méthodes directe (Test des spots) :**

Les résultats de test des spots ont montré un important potentiel antimicrobien de souche *Lactobacillus plantarum* à l'égard de *Staphylococcus aureus* qui se traduit par l'apparition des zones d'inhibition autour des spots (**Figure 05**).



**Figure 05 :** Exemples de résultats obtenus par le test de spots à l'égard de *S. aureus*

Le diamètre des zones d'inhibition obtenu est de 21 mm. On pourrait attribuer ce phénomène aux différents métabolites excrétés tels que : l'acide lactique, d'autres acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines et le dioxyde de carbone (Leveau et al. 1991 ; Klaenhammer et al. 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007).

Les études de Makras et al., (2006), ont déjà confirmé l'activité antagoniste de *Lactobacillus plantarum* contre les bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus* (Mami et al., 2010) dont ils ont démontré l'activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

De ce fait, l'effet antagoniste obtenu dans ce travail peut être dû aux différents métabolites produits par les souches de *Lactobacillus* selon De vuyst et vandamme (1994). Un tel antagonisme bactérien pourrait résulter des effets combinés de plusieurs mécanismes au cours de leur croissance. Ceux-ci peuvent comprendre : la production d'acide lactique conduisant à une diminution du pH et la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), tous deux connus pour être inhibiteurs contre Gram+ et Gram-, compétition pour les nutriments disponibles, production de protéines spécifiques appelées bactériocines (Fang et al., 2007).

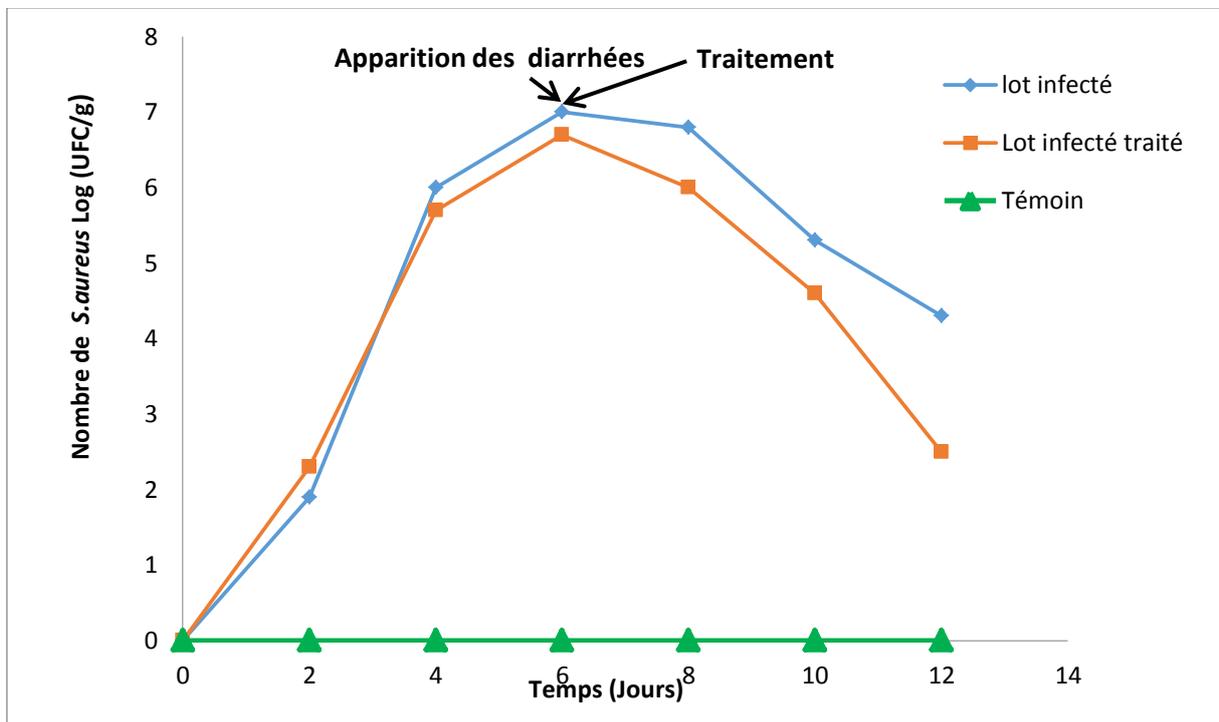
A noter que l'acide lactique est le métabolite principal de bactéries lactiques causant la réduction du pH qui inhibe largement les micro-organismes (Eklund, 1989 ; Schnurer et Magnusson, 2005). Hicks et Goepfert (1968) ont bien confirmé que l'acide lactique et l'acide acétique produit par les bactéries lactiques participent à l'inhibition de *Staphylococcus*

*aureus*. En outre, la croissance de certaines cultures lactiques entraîne la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est considéré comme un inhibiteur de la croissance bactérienne (Julliard et al., 1987). Cependant, cet agent peut être dégradé par une enzyme, la catalase, présente chez certaines espèces bactériennes telles que *S.aureus*. De plus, l'activité inhibitrice dans ce test est majeure en raison de la production continue des métabolites tant que les cellules sont toujours présentes et vivantes.

#### 4. Étude *in vivo* de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus palntarum* XS à l'égard de *S.aureus* chez des rats holoxéniques :

##### 4.1. Dénombrement de *Staphylococcus aureus* :

Les résultats du dénombrement de *Staphylococcus aureus* utilisé pendant la période de l'expérimentation animale sont représentés sur la figure 06.



**Figure 06:** Dénombrement de *S. aureus* pendant la période de l'expérimentation animale.

Les dénombrements de *S. aureus* à Jo (avant la contamination), montrent que les rats utilisés dans cette étude ne renferment pas cette bactérie dans leur flore fécale.

De nombreuses études descriptives ont montré que la colonisation du tractus gastro-intestinal diffère d'une espèce animale à l'autre.

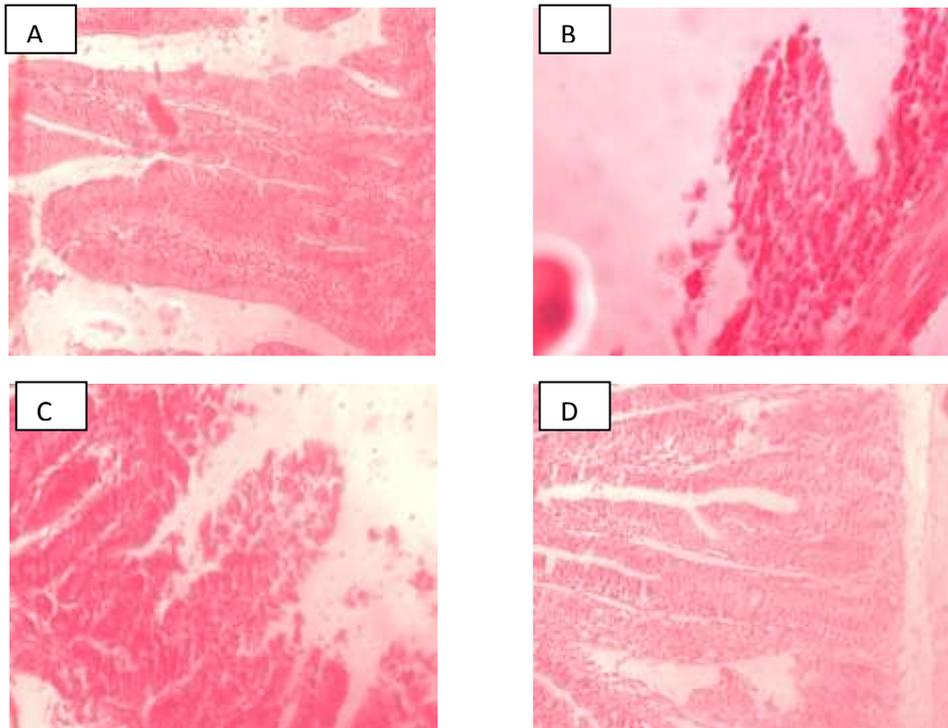
Ainsi, chez le rat et la souris, la colonisation de l'estomac et de l'intestin est assez semblable de la naissance au sevrage. Les bactéries dominantes sont des anaérobies facultatifs appartenant essentiellement aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Les entérobactéries et les genres anaérobies stricts ne font pas partie de la flore dominante (Raibaud et al., 1966). Chez les rats, la flore anaérobie stricte du gros intestin prédomine comme chez la souris, mais les genres dominants ne sont pas les mêmes (Raibaud et al., 1966). La microflore du rat est caractérisée par une forte prédominance de *Bacteroides* dans le cæcum et le gros intestin (Mahmoudi, 2014).

Au niveau des lots infectés et infectés traités, le nombre de *S. aureus* augmente, pour atteindre 7 Log au bout de 6 jours de contamination, qui est la dose infectieuse provocatrice de la diarrhée. Au niveau du lot infecté traité, le nombre de *Staphylococcus aureus* commence à diminuer après 2 jours de traitement avec *Lactobacillus plantarum* XS, par rapport au lot non traité. Au terme de 6 jours de traitement 4,3 Log pour les rats non traités et 2,5 log pour les traités.

### 4.2. Coupes histologiques :

- **Observations microscopiques des coupes réalisées sur l'intestin grêle :**

Au niveau de l'intestin grêle des rats infectés par *Staphylococcus aureus* (figure 07 B), un effacement, altération et un raccourcissement des villosités sont constatés. Contrairement à l'observation au niveau de l'intestin grêle des rats du lot témoin (figure 07 A), qui montre un épithélium intestinal de structure normale avec des villosités très apparentes et bien définies. Pour l'intestin grêle traité avec *Lactobacillus plantarum* XS, (figure 07 C), une régénération de l'épithélium intestinal est observée. Alors que, pour les rats non traités (figure 07 D), les observations des coupes histologiques montrent encore des zones atrophiques et de cellules intestinales détachées. Ce qui confirme l'efficacité au niveau du l'intestin grêle, du traitement avec la bactérie lactique utilisée.



**Figure 07:** Observations microscopiques des coupes réalisées sur l'intestin grêle des rats des quatre lots (A : Témoin, B : Infecté, C : Infecté traité, D : Infecté) aux grossissements 10 et 40.

Les anomalies observées au niveau de l'intestin grêle peuvent être interprétées par la pathogénicité de la souche de *Staphylococcus aureus* attribuée à une combinaison de certains facteurs extracellulaires, telles que la sécrétion des toxines, et la capacité de ces souches à adhérer aux molécules de matrice grâce aux différentes protéines des composants microbiens de surface identifiant les molécules adhésives de matrice (MSCRAMMs ; microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) qui sont impliquées dans l'adhésion de *Staphylococcus aureus* (Foster et Hook., 1998).

La responsabilité de *S. aureus* en tant qu'agent étiologique des DAA (diarrhées associées aux antibiotiques) et des colites pseudomembraneuses a été évoquée dès 1950 car la bactérie a été isolée de façon prédominante dans les selles de patients présentant des diarrhées survenues après une antibiothérapie (Oeding *et al.*, 1954; Altemeier *et al.*, 1963).

# *Conclusion*

## Conclusion

La souche *Lactobacillus plantarum* XS a été isolée puis identifiée. Elle est retenue et soumise à des tests physiologiques et biochimiques. Elle est caractérisée par sa forme bacille, Gram positif, catalase négative et immobile.

*Lb plantarum* identifiée a été testée pour évaluer son activité antimicrobienne vis-à-vis d'une souche pathogène à Gram positif *Staphylococcus aureus*. Les résultats du test de l'effet antimicrobien de celle-ci *in vitro* montrent qu'elles possèdent une activité antagoniste importante à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

L'administration par voie orale de cette bactérie a permis de stopper la diarrhée provoquée par le germe pathogène et aussi de protéger la muqueuse intestinale en empêchant le détachement de celle-ci. Nous avons constaté aussi qu'elles ont un effet préventif.

A travers l'étude histologique des fragments intestinaux, nous avons remarqué la régénération des villosités de la muqueuse intestinale endommagées chez les rats traités, cela confirme que la souche testée possède réellement un potentiel probiotique.

A la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons conclure que la souche *Lactobacillus plantarum* XS dispose d'une activité antibactérienne inhibitrice et peut, de ce fait, être une source précieuse de souche probiotique.

Les résultats de notre étude permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives, pour compléter ce travail, il faut :

- Utiliser *Lactobacillus plantarum* dans l'éradication des infections causées par des germes multi-résistants au lieu d'utiliser des antibiotiques.
- Mener des recherches approfondies pour connaître la nature exacte des facteurs inhibiteurs (acide lactique, bactériocines, etc...) à l'égard des souches pathogènes.
- Elargir les études pour pouvoir faciliter l'extraction des substances antimicrobiennes qui sont responsables de l'effet bénéfique chez *Lactobacillus plantarum* afin d'élargir l'activité thérapeutique des médicaments à base de cette bactérie.
- Tester l'effet de *Lactobacillus plantarum* sur une large gamme de micro-organismes à Gram positif et négatif.

*Références*  
*bibliographique*

## *Références bibliographiques*

- Adams, M.R et Marteau, P. (1995).** On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol* 27: 263-264.
- Agaliya, PJ et Jeevaratnam, K. (2012).** Screening of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented Idli batter for probiotic properties. *Afr J Biotechnol* 11:12856–12864.
- Aguirre, M et Collins, M.D. (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 75: 95-107.
- Al Kassaa, I. Hamze, M. Hober, D. Chihib, NE. et Drider, D. (2014).** Identification of vaginal *lactobacilli* with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *MicrobEcol* 67: 722–734.
- Ammor M. S. et Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production, an update. *Meat Science* 76 : 138-146.
- An, Y. Wang, Y. Liang, X. Yi, H. Zuo, Z. Xu, X. Zhang, D. Yu, C. et Han, X. (2017).** Purification and partial characterization of M1-UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage. *Food Control* 81 : 211-217.
- Axelsson, L. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Clasification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspect*. Third Edition. Marcel Dekker, New York, 1-66.
- Badis, A. Laouabdia-Sellami, N. Guetarni, D. Kihal, M. et Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences & Technologie* 23 :30-37.
- Barefoot, S. F et Klaenhammer, T R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45 (6): 1808-1815.
- Bringel,F. Castioni, A. Olukoya, DK. Felis, GE. Torriani, S. et Dellaglio, F. (2005).** *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. *Nov*, isolated from vegetable matrices. *Int J SystEvolMicr* 55:1629–1634.
- Buyze, G. Van Den Hamer, C.J.A. et De haan, P.G. (1957).** Antonie van Leeuwenhoek, 23: 345-350.
- Carina Audisio, M. Yorres, M. Sabate, D. Ibarguren, C et Apell, M. (2010).** Properties of differents Lactic Acid Bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research* 166(1):1-13.
- Carr, F. J. Chill, D et Maida, N. (2002).** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28 (4): 281-370.

## Références bibliographiques

- Chang, MH. Hong, SF. Chen, JH. Lin, MF. Chen, CS. et Wang, SC. (2016).** Antibacterial activity *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented vegetables and investigation of the plantaricin genes. *Afr J Microbiol Res* 10:796–803.
- Corsetti, A et Valmorri, S. (2011).** Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus spp.:Lactobacillus plantarum*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* 3: 111-118.
- Cotter, P. Ross, P. et Hill, C. (2013).** Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics? *Nature ReviewsMicrobiology* 11: 95-105.)
- De Roissart, H.B. (1986).** Bactéries lactiques. In *Laits et produits laitiers vache, brebis et chèvre*. Tome 3. Paris, Technique et documentation. Lavoisier, pp 343-408.
- De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., de Vos, et W.M. (2006).** *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J* 16 : 1018-1028.
- De vuyst, L. et Vandamme, E. J. (1994).** Antibacterial potential of Lactic Acid Bacteria. Dans: *Bactériocin of Lactic Acid Bacteria*. Ed. Blacki academic & profetionel, Londre, p 91-190.
- Dellaglio, F. de Roissard, H. Torriani, S. Curk, M.C. et Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: *Bactéries lactiques* (De Roissard, H. et Luquet, F.M.). *Lorica, Uriage*. 1: 25 116.
- Dortu, C. et Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement* 13(1) : 143-154.
- Dortu, C., et Thonart, Ph. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(1), 349-356.
- Drider, J et PREVOST, H. (2009).** Bactéries lactiques. *Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris : Economica.592.
- Eklund, T. (1989).** Organic Acids and Esters. In: Gould, G.W. (Ed), *Mechanisms of Action Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, pp.161-200.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2001 :** Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba (Argentina).

## Références bibliographiques

- Gomez, N. C. Ramiro, J. M. Quecan, B. X. et de Melo Franco, B. D. (2016).** Use of potential probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers In Microbiology* 7: 863.
- Guiraud, J.P. et Rosec, J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR, 241 p.
- Hassaine, O. (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. (Thèse). Université d'Oran Es-sénia. pp.2
- Hernandez, D. Cardell, E et Zarate, V. (2005).** Antimicrobial activity of Lactic Acid Bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711 Abacteriocin-like Substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J of Applied Microbiology* 99: 77-84.
- Hicks, R. et Goepfert, J.M. (1968).** Effect of Volatile Fatty Acids on *Salmonella Typhimurium*, American Society of Microbiology, J of bacteriology p 956 -958.
- Hogg, T. (2005).** Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188- 190.
- Jasniewski, J. (2008).** Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. PhD thesis, Nancy- Université, Nancy, p. 155.
- Julliard, V. Spinnler, H.E. Desmazeaud, J. et Boquien, C.V. (1987).** Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait*, 67(2) : 149-172.
- Kaktcham, P. M. Kouam, E. M. F. Tientcheu, M. L. T. Temgoua, J. B. Wachter, C. Ngoufack, F. Z. et de Lourdes Perez-Chabela, M. (2019).** Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2MT isolated from freshwater Nile tilapia in Cameroon: Bacteriocin screening, characterization, and optimization in a low-cost medium. *LWT. Food Science and Technology* 107 : 272-279.
- Kandler, O. et Weiss, N. (1986).** In Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol.2. Eds, P.H.A Sneath et al, Williams Wilkino, Baltimore, P.1209.
- Kim, J.W. et Rajagopal, S.N. (2001).** Antibacterial activities of *Lactobacillus crispus*
- Klaenhammer, TR. (1988).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie* 70:337-49.
- Klaenhammer, TR. (1994).** Genetics of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12 :39-85.

## Références bibliographiques

- Kleerebezem, M. Boekhorst, J. Kranenburg, R.V. Molenaar, D. Kuipers, O. P. Leer, R. Tarchini, R. Sander, A.P. Sandbrink, M.H. Fiers, M.W.E.J. Stiekema, W. Klein Lankhorst, R.M. Bron, P.A. Sally, M.H. Masja, N.N. Robert, K. Maaïke de, V. Bjorn, U. de Vos, W.M et Siezen, R.J. (2003).** Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. PNAS, 100 (4): 1990-1995.
- König, H. et Fröhlich, J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Édité par Springer Verlag. Berlin Heidelberg.
- Mahmoudi, F. (2014).** Les substances antimicrobiennes produites par les Bifidobacterium et leurs effets sur les bactéries entéropathogènes (thèse). Université d'Oran. pp.66.
- Makarova, K. Slesarev, A. Wolf, Y. Sorokin, A. Mirkin, B. Koonin, E. Pavlov, A. Pavlova, N. Karamychev, V. Polouchine, N. Shakhova, V. Grigoriev, I. Lou, Y. Rohksar, D. Lucas, S. Huang, K. Goodstein, D.M. Hawkins, T. Plengvidhya, V. Welker, D. Hughes, J. Goh, Y. Benson, A. Baldwin, K. Lee, J.H. Díaz-Muñiz, I. Dosti, B. Smeianov, V. Wechter, W. Barabote, R. Lorca, G. Altermann, G. Barrangou, R. Ganesan, B. Xie, Y. Rawsthorne, H. Tamir, D. Parker, C. Breidt, F. Broadbent, J. Hutkins, R. O'Sullivan, D. Steele, J. Unlu, G. Saier, M. Klaenhammer, T. Richardson, P. Kozyavkin, S. Weimer, B. et Mills, D. (2006).** Comparative genomics of the Lactic Acid Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (42): 15611-15616.
- Makhloufi, KM. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. PhDThesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Paris, p. 228.
- Makras, E. et De Vuyst, L. (2006).** The in vitro inhibition of Gram-negative Pathogenic bacteria by *Bifidobacteria* is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J* 16: 1049-1057.
- MAMI, A. HAMED, A. R. HENNI, J. E. KERFOUF, A. et KIHAL, M. (2010).** Activité Antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus* LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE, Volume 5 : N°21.
- Melgar-Lalanne. (2012).** *Lactobacillus plantarum: An overview with emphasis in biochemical and healthy Properties.*
- Mogensen, G. Salminen, S. O'Brien, J. Ouwehand, A. et al (2002).** Food microorganisms \_ health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bulletin of the International Dairy Federation* 377:4-19.

## Références bibliographiques

- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G.E. et Torriani, S., (2010).** *Diversity of stress tolerance in Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus paraplantarum: A multivariate screening study. Int J of Food Microbiology* 144: 270-279.
- Quiberoni, A. Rezaiki, L. El Karoui, M. Biswas, I. Tailliez, P. et Gruss, A. (2001).** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *ResMicrobiol* 152: 131-139.
- Raibaud, P., Dickinson A.B., Sacquet E., Charlier, H., et Moquot G. (1966).** La microflore du tube digestif du rat. II. Dénombrement de différents genres microbiens dans l'estomac et l'intestin de rats conventionnels. Variations quantitatives individuelles et en fonction de l'âge. *Ann Inst. Pasteur* 110: 861-876.
- Salminen, S. Wright, A.V et Ouwehand, A. (2004).** Lactic Acid Bacteria microbiological and functional aspects. Edited by Marcel Dekker. 633p.
- Schlegel, HG. (1999).** Bacteriology paved the way to cell biology: a historical account. In: Lengeler, JW. Drews, G. Schlegel, HG. Edtors. *Biology of the prokaryotes*. Stuttgart: Thieme, Blackwell.
- Schnurer, J. et Magnusson, J. (2005).** Antifungal Lactic Acid Bacteria as biopreservative. *food Sc.Technol* 16 :70-78.
- Siezen, R.. et van HylckamaVlieg, J. (2011).** Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum* a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories* 10: 1-13.
- Stiles, M. E. et Holzappel, W. H. (1997).** Lactic Acid Bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36: 1-29.
- Tagg, J.R. Dajani, A.S. et Wannamaker, L.W. (1976).** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40: 722-756.
- Tailliez, P. (2001).** Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le Lait*, 81(1-2), 1-11.
- Thornhill, P. J. et Cogan, T. M. (1984).** Use of gas-liquid chromatography to determine the end products of growth of Lactic Acid Bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 47(6): 1250-1254.
- Todorov, S.D., Ho, P., Vaz-Velho, M., Dicks, et L.M.T. (2010).** Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science* 84 :334-343.

## *Références bibliographiques*

Wang, J. Ji, H. Zhang, D. Liu, H. Wang, S. Shan, D. et Wang, Y. (2011). Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* ZLP001 isolated from gastro intestinal tract of weaning pigs. *Afr J Biotechnol* 10:11303–11308.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., et Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus* : Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(4) : 2782-2858.

**Site:**

<https://m.actuenvironnement.com/dictionnaireenvironnement/definition/formol.html#:~:text=Compos%C3%A9%20organique%20de%20la%20famille,titre%20employ%C3%A9%20pour%20la%20taxidermie.>

# **Annexes**

## **Annexes 01 : Matériel utilisé**

### **1. Appareillage**

- ❖ Congélateur (Samsung)
- ❖ Réfrigérateur (ENIEM)
- ❖ Autoclave (Omron, E5C4, H2C)
- ❖ Etuve réglable à différentes températures (à 30 et 44°C) (Mettler)
- ❖ Four pasteur (Controls)
- ❖ Incubateur
- ❖ centrifugeuse
- ❖ Microscope Optique (Zeiss)
- ❖ Bain Marie (Raypa)
- ❖ pH mètre (Hanna)
- ❖ Balance (Sartorius)
- ❖ Vortex électrique (VELP)
- ❖ Bec bunsen.

### **Les verreries usuelles**

- ❖ Boîtes pétri
- ❖ Bêchers
- ❖ Tubes à essais
- ❖ Erlenmeyer
- ❖ Fioles
- ❖ Pipette pasteur
- ❖ Flacon
- ❖ Burettes
- ❖ Entonnoirs

En plus des écouvillons, micropipette (Accumax), embouts, flacons, anse de platine...etc.

### **2. Solution et réactifs**

- ❖ Violet de gentiane, Fuchsine.
- ❖ Lugol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ❖ NaOH.

**Annexe 02 : Composition des milieux de cultures utilisés.****Tableau I :** Composition de l'eau physiologique

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Chlorure de sodium	9g
Eau distillé (QSP)	1L
<b>pH = 7</b>	

**Tableau II :** Composition du bouillon MRS (de Man, Rogosa et Sharpe, 1960).

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bi potassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de manganèse	0,05g
Eau distillé (QSP)	1L
<b>pH = 6,5</b>	

**Tableau III:** Composition du bouillon nutritif

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée (QSP)	1L
<b>pH = 7,2</b>	

**La composition de la gélose nutritive est : bouillon nutritif plus  
15g d'agar.**

**Tableau V :** composition de la gélose Mueller-Hinton.

<b>composition</b>	<b>Quantité</b>
Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
<b>pH = 7,4</b>	

**NB :** les milieux de culture ont subi un autoclavage à 121°C pendant 20 min.

## **Résumé :**

L'objectif principal de la présente étude est d'évaluer l'effet antibactérien de la souche *Lactobacillus plantarum* XS vis-à-vis d'une souche pathogène *Staphylococcus aureus*.

L'étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne montre que la bactérie a une activité antagoniste et inhibitrice très intéressante à l'égard de la bactérie pathogène testée. Une zone d'inhibition de 21 mm a été enregistrée par la méthode de diffusion en spots.

Les résultats de l'activité antimicrobienne *in vivo* ont montré que la souche possède un effet antibactérien qui lui permet d'inhiber le pathogène.

L'interaction de cette souche dans le tractus gastro-intestinal du rat Wistar après gavage a permis d'obtenir les résultats suivants : inhibition du micro-organisme pathogène, protection de la muqueuse intestinale, traitement de la diarrhée infectieuse induite par *Staphylococcus aureus*.

L'étude histologique des fragments intestinaux confirme l'effet probiotique de la souche *Lactobacillus plantarum* XS et cela explique la régénération de la muqueuse intestinale endommagée chez les rats du lot traité.

**Mots-clés :** *Lactobacillus plantarum*, effet anti bactérien, *Staphylococcus aureus*, *in vivo*.

## **Abstract :**

The main objective of this study was to evaluate the antibacterial effect of *Lactobacillus plantarum* XS strain against a pathogenic strain *Staphylococcus aureus*.

The *in vitro* study of the antimicrobial activity shows that the bacterium has a very interesting antagonistic and inhibitory activity towards the pathogen tested. An inhibition zone of 21 mm was recorded by the spot diffusion method.

The results of the *in vivo* antimicrobial activity showed that the strain possesses an antibacterial effect that enables it to inhibit the pathogen.

The interaction of this strain in the gastrointestinal tract of the Wistar rat after gavage provided the following results: inhibition of the pathogen, protection of the intestinal mucosa, treatment of infectious diarrhoea induced by *Staphylococcus aureus*.

The histological study of the intestinal fragments confirms the probiotic effect of the *Lactobacillus plantarum* XS strain and this explains the regeneration of the damaged intestinal mucosa in the rats of the treated batch.

**Keywords :** *Lactobacillus plantarum*, antibacterial effect, *Staphylococcus aureus*, *in vivo*.