

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abderrahmane Mira de Béjaia

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 :

Etude de quelques propriétés probiotiques de *Lb.plantarum* et leur pouvoir antagoniste à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

Présenté par :

BOUCHEKOUT AMINA et AMARI ASSIA

Soutenu le : 17/07/2022

Devant le jury composé de :

Dr. YANAT Présidente MCA

Dr. FARADJI Encadreur MCA

Dr. OUARABI Examineur MAB

2021/2022



Remerciements

Avant tout propos, nous remercions, en premier lieu, Allah pour nous avoir donnée la santé, le courage et la résolution pour réaliser ce travail

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à notre promotrice Mme FARADJI pour ses conseils et la supervision nous ont fourni l'occasion et l'environnement propice pour effectuer cette étude

Nos remerciements les plus sincères vont à Mme YANAT Qui nous fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer notre travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement Mme OUARABI d'avoir accepté et consacré du temps pour examiner notre travail.

Le grand merci est à nos parents et à nos familles qui nous ont soutenus durant toutes ces années d'études et qui nous ont encouragés sans cesse.

BOUCHEKOUT Amina et AMARI Assia

Dédicaces

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

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études

A mon cher frère toufik, qui m'a aidé et encouragé à terminer ce travail

A mes sœurs farida, sohila, hassiba et nassima

A mes frères lyas, nabil, nassim, yassir et abd el moumen.

À ma meilleure amie wassila qui m'a toujours soutenue.

À tous mes amis en particulier rokaia et tinhinan.

À mon binôme assia avec qui j'ai partagé ce travail.

À tous ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin

A. BOUCHEKOUT

Dédicaces

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail
À Mes cher parents ; symbole de sacrifice, de tendresse
d'amour. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour
que vous me portez de puis mon enfance et j'espère que
votre bénédiction m'accompagne toujours. Merci de m'avoir
soutenu tout au long de ces années.*

*À mes chères soeurs Sabrina et Nassima pour leurs
encouragements et pour leurs aides dans les moments
difficiles*

À mes meilleurs amies Cilia, Roza, Wissam et Nariman .

À ma binôme Amina avec qui j'ai partagé ce travail .

A.AMARI

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction.....01

Partie 01 : synthèse bibliographique

I. Les Lactobacilles

I.1. Le genre *Lactobacillus*03

I.2. Ecologie et habitat des *Lactobacilles*..... 03

I.3. Classification des Lactobacilles.....04

I.4. L'espèce *Lactobacillus plantarum*.....05

I.4.1. Propriétés biochimiques du *Lb.plantarum*.....05

I.4.2. L'activité antimicrobienne du *Lb. plantarum*.....06

I.4.3. Les substances antimicrobiennes produites par *Lb. Plantarum*.....06

I.4.3.1. Acides organiques.....06

I.4.3.2. Peroxyde d'Hydrogène.....07

I.4.3.3. Dioxyde de Carbone.....07

I.4.3.4. Acides grass hydroxylé.....07

I.4.3.5. Bactériocines.....08

I.4.4. Les propriétés probiotiques de *Lb.plantarum*.....08

I.5. Critères de sélection des souches probiotiques.....09

I.5.1. Le choix de souches microbiennes09

I.5.2. L'activité antimicrobienne.....09

I.5.3. L'adhésion et colonisation de tissu épithélial intestinal.....09

I.5.4. Résistance aux conditions *in vivo*.....10

II. Les Staphylocoques

II.1. Historique.....10

II.2. Généralité.....11

II.3. Ecologie et habitats.....11

II.4.	Classification.....	11
II.5.	Le genre <i>S.aureus</i>	12
II.5.1.	Caractères morphologique.....	12
II.5.2.	Caractères biochimiques.....	12
II.5.3.	Caractères cultureux.....	13
II.5.4.	Les entérotoxines Staphylococciques.....	13
II.5.5.	Toxi-infection alimentaire à <i>Staphylococcus aureus</i>	15

Parti 02 : Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I.1.	Matérielles biologiques	17
I.2.	Revivification et purification des souches.....	17
I.3.	Vérification de la pureté des souches bactériennes	17
I.4.	Standardisation des souches bactériennes	18
I.5.	Etude de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	18
I.5.1.	Préparations des cultures fraîches.....	18
I.5.2.	Méthode directe (tests des spots).....	19
I.5.3.	Méthode indirecte (tests des puits).....	21
I.6.	Potentiel probiotique de <i>Lb.plantarum</i>	22
I.6.1.	Résistance aux sels biliaires.....	22
I.6.2.	Résistances à l'acidité.....	22
I.6.3.	Adhésion sur la microplaque en polystyrène.....	22

II. Résultats et discussions

II.1.	Revivification et purification des souches.....	24
II.2.	Standardisation des souches bactériennes.....	26
II.3.	Etude de l'activité antimicrobienne.....	26
II.3.1.	Méthode directe (tests de spots).....	26
II.3.2.	Méthode indirecte (tests des puits).....	28
II.3.3.	Tests des puits après neutralisation.....	29
II.4.	Potentiel probiotiques de <i>Lb.plantarum</i>	31
II.4.1.	La résistance aux sels biliaires.....	31
II.4.2.	La résistance aux pH faible.....	31
II.4.3.	L'adhésion sur la microplaque en polystyrène.....	32

Conclusion.....34

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

Aw : activité de l'eau

BN : Bouillon Nutritif

DO : Densité Optique

FAO : Food and Agriculture Organization

GRAS : generally recognized as safe

LAB : Lactic Acid Bacteria

Lb. : *Lactobacillus*

N: Normalité

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

S.: *Staphylococcus*

TSB : Bouillon Tryptone-Soja

Liste des tableaux

Tableau n°	Titre	Page
I.	origine et code des souches bactériennes utilisées	17
II.	Résultats de l'activité antimicrobienne de <i>Lb.plantarum</i> à l'égard de <i>S.aureus</i> avec test de spots	27
III.	Résultats de l'activité antimicrobienne du surnageant de <i>Lb.plantarum</i> vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	28
IV.	Résultats de l'activité inhibitrice de surnageant neutralisé de <i>Lb.plantarum</i> vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	29
V.	Classification de l'adhésion bactérienne	32

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
01	Schéma illustrant les étapes du test des spots	20
02	Schéma illustrant la méthode de diffusion en puits	21
03	Aspect de la culture de <i>Lb.pluntarum</i> dans le bouillon MRS	24
04	Aspect macroscopique des souches Lb9 et Lb 47 sur gélose MRS	25
05	Aspect macroscopique des souches de <i>S.aureus</i> sur gélose Chapman	25
06	Exemple de résultats obtenu par test de spot à l'égard de <i>S.aureus</i>	26
07	Exemple de résultats obtenu par test des puits vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	28
08	l'Activité inhibitrice de Lb9 et Lb47 enregistré par tests des spots, surnagent et surnagent neutralisé vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	30

Introduction

Introduction

A partir du XIX^{ème} siècle, après la découverte des « bactéries lactiques », un intérêt s'est développé pour les microorganismes (**Preedy, 2010**). Les bactéries lactiques se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé. Il y a eu un grand intérêt à l'utilisation des différentes souches de bactéries lactiques comme probiotiques, pour améliorer la santé des humains et des animaux. Elles ont été utilisées comme probiotiques pour traiter certains troubles intestinaux tels que l'intolérance au lactose, la gastro-entérite aiguë, la constipation et les maladies inflammatoires de l'intestin (**Halász, 2009**).

Les probiotiques sont des compléments alimentaires microbiens vivants ayant des effets bénéfiques sur l'hôte par l'amélioration de l'équilibre microbiens intestinal. Les bactéries lactiques probiotiques regroupent principalement les genres *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (**Mokoena et al., 2016**). Les espèces associées aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont été considérées comme étant les souches bactériennes les plus utilisées. Les espèces représentatives sont *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *B. lactis*, *B. longum* et *B. bifidum* (**Shi et al., 2016**).

Parmi les propriétés importantes des probiotiques est la protection du tractus intestinal de l'hôte contre certains agents pathogènes et cela est dû à sa capacité à produire des métabolites tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyle, l'acétaldéhyde, et les bactériocines (**Šušković et al., 2010**).

Lactobacillus plantarum est une espèce importante dans la production d'aliments fermentés. En raison des effets bénéfiques de ces bactéries sur la santé du système digestif humain et de la production de composés antimicrobiens, *Lb. plantarum* est introduite et identifiée comme un microorganisme à potentiel probiotique (**Jabbari et al., 2017**). Elle exerce une activité inhibitrice contre une variété de bactéries à Gram-positif potentiellement nocif tels que *Listeria monocytogenes* et *S. aureus* (**Dinev et al., 2018**). *S. aureus* est l'agent causal d'un large éventail d'infections allant des lésions superficielles aux septicémies menaçant le pronostic vital. Il est également responsable d'intoxications alimentaires par ingestion soit d'aliments contaminés par *S. aureus*, soit de l'endotoxine produite (**Shah et al., 2016**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, qui consiste à étudier l'activité antibactérienne de deux souches de *Lb.plantarum* à l'égard de *S. aureus*.et d'évaluer *in vitro* quelques propriétés probiotiques de ces dernières.

Partie 01 :

Synthèse bibliographique

Partie 01 : Synthèse bibliographique

I. Les Lactobacilles

I.1. Le genre *Lactobacillus*

Les Lactobacilles sont des bactéries Gram positives en forme de batonnet.se présentant sous forme de cellules individuelles ou de chaînes (**Alcamo, 1996**). elles appartient au phylum des Firmucutes , à la classe des *Bacilli* et l'ordre des Lactobacillales. Ce sont des bactéries micro-aérophiles (**Barrangou et al., 2012**). Elles sont strictement fermentaires, aérotolérants ou anaérobie, acidophiles, leurs besoins nutritionnels sont complexes (glucides, acides aminés, peptides, esters d'acides gras, sels, dérivés d'acides nucléiques et vitamines). Les lactobacilles sont éventuellement homo-fermentaires, produisant environ 85% d'acide lactique, ou hétéro-fermentaires en plus de l'acide lactique ils produisant du CO₂, de l'éthanol (et / ou de l'acide acétique), en quantité équimolaires. À la présence d'Oxygène ou d'autre oxydants, elles peuvent produire des quantités indéfinies d'acétate aux dépends de lactate ou de l'éthanol, de sorte qu'une mole supplémentaire d'ATP est obtenue via lactate kinase. Les Lactobacilles sont présentes essentiellement là où des substances riches en hydrates de carbone sont disponibles. (**Hammes et Vogel, 1995**).

I.2. Ecologie et habitats des Lactobacilles

Les Lactobacilles occupent de nombreuses niches écologiques différentes dans la nature. Au sein des membres du règne animal, des abeilles aux humains, les lactobacilles font partie du microbiote naturel des animaux hôtes et occupent diverses niches au sein de l'hôte telles que le tractus gastro-intestinal, urogénital, la cavité buccal et la peau. Les lactobacilles sont présents en milieu laitier et sont particulièrement abondants dans les produits laitiers fermentés. De plus, les lactobacilles sont naturellement présents dans les plantes et le sol. *Lb.plantarum* à été signalé comme étant une espèce bactérienne naturelle dominante dans les légumes comme le chou et la laitue. Les lactobacilles se trouvent également dans les aliments non laitiers fermentés. Des espèces de *Lactobacillus* ont en outre été isolées à partir d'échantillons de sol exemples *Lb.plantarum*, *Lb.paracasei subsp.paracasei* et *Lb.brevis* (**Barrangou et al., 2011**).

Chez l'homme, les Lactobacilles se trouvent dans tout le tractus gastro-intestinal, de la cavité buccale au gros intestin. Dans la cavité buccale, les Lactobacilles de la cavité buccale peuvent offrir une protection contre les microorganismes nocifs, mais en tant que producteurs

d'acide. En plus des niches naturelles de *Lactobacille*, les espèces du genre sont largement utilisés dans la fabrication de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux, et dans le commerce comme microorganismes bénéfiques pour la santé (probiotique) (**Barrangou et al., 2011**).

I.3. Classification des lactobacilles

Les Lactobacilles ont été initialement classés par Orla et Jensen dans les homofermentaires et hétéro-fermentaires en fonction de la quantité d'acide lactique formé pendant la fermentation du glucose. Orla et Jensen ont également divisé les lactobacilles en trois groupes (les thermobactéries, les streptobactéries et bêtabactéries) en fonction de la température de croissance et des réactions biochimiques. Bien que ces trois groupes aient été remplacés pour la plupart, les trois noms sont définis en fonction de la croissance température, capacité à produire du dioxyde de carbone à partir de glucose ou de gluconate, besoin en thiamine, formation d'acide lactique comme produit principal de la fermentation, type de fermentation homo-fermentaire et hétéro-fermentaire, réduction du fructose en mannitol et hydrolyse de l'arginine (**Carr et al., 2002**).

I.3.1. Les Bêtabactéries : sont des microorganismes hétéro-fermentaires, mésophiles, qui se développent à 15°C. Elles se différencient des *Lactobacilles* par la formation du dioxyde de carbone par fermentation du glucose et la plupart hydrolysent l'arginine. Elles fermentent le ribose. Les bêtabactéries, cependant, ne diffèrent pas seulement des deux autres groupes en étant hétéro-fermentaires (formant du CO₂ à partir du glucose), mais diffèrent également en hydrolysant l'arginine et nécessitent de la thiamine pour leur croissance (**Carr et al., 2002**).

I.3.2. Les Streptobactéries : les Streptobactéries sont des microorganismes homo-fermentaire, mésophiles, qui produisent du dioxyde de Carbone (CO₂) à partir du gluconate mais pas à partir du glucose, avec un développement optimale à 15°C (**Carr et al., 2002**).

I.3.3. Les Thermobactéries : les thermobactéries sont des microorganismes thermophiles et homo-fermentaires, ne forment ni dioxyde de carbone à partir de glucose ni de gluconate ni ne se développent à 15°C, mais se développent à 45°C au plus. ils ne parviennent pas non plus à hydrolyser l'arginine. Ne fermentent pas le ribose (**tableau I, annexe 03**) (**Carr et al., 2002**).

Parmi Les bactéries lactiques *Lactobacillus* est peut être le genre le plus prédominant. Et parmi les *Lactobacillus*, *Lb.pluntarum* est l'espèce la plus polyvalente avec des propriétés

utiles et se trouve généralement dans de nombreux produits alimentaires fermentés (Behera *et al.*, 2018).

I.4. L'espèce *Lactiplantibacillus plantarum*

Lb. plantarum c'est une espèce bactérienne (Spanol *et al.*, 2002). Gram positive (Rodríguez-Huezo *et al.*, 2014). Forme de bâtonnet court ; c'est une bactérie à catalase négative, non sporulée, facultativement anaérobie, micro-aérophile, fait partie des bactéries lactiques (Dinev *et al.*, 2018) (figure 01,annexe 04). Est un lactobacille hétéro-fermentaires facultatif et métaboliquement flexible et polyvalent, rencontré dans de nombreuses niches environnementales à large applications (Melgar-Lalanne *et al.*, 2012) .

Lb. plantarum C'est une espèce importante participant à la fermentation de nombreux produits végétaux (ensilage, choucroute, olives saumurées, cornichons), du levain, des fromages, des saucisses fermentées et du stockfisch. Il appartient à l'espèce probiotique *Lactobacillus* habitant le système digestif humain et produisant des bactériocines, des exopolysaccharides, des protéines extracellulaires. Ils améliorent la santé et la physiologie de l'hôte en interagissant avec les cellules épithéliales et en renforçant le système immunitaire de l'hôte. Récemment, *Lb.plantarum* été appliqué en médecine humaine pour le traitement de l'inflammation chronique associée à diverses maladies, notamment le cancer. Des études comparatives entre différents probiotiques ont montré que les souches de *Lb. plantarum* présentaient le plus large spectre d'activité antimicrobienne parmi les bactéries probiotiques examinées (Dinev *et al.*, 2018).

Lb.plantarum est introduit et identifié comme les microorganismes probiotiques potentiels et à la capacité de fermenter différents glucides et une tolérance élevée à un pH bas (Jabbari *et al.*, 2017). Les souches de *Lb. Plantarum* ont été identifiées à partir de nombreux aliments traditionnels et caractérisées pour leur systématique qui sont illustrés en (tableau II, annexe 03) (Behera *et al.*, 2018).

I.4.1. Propriétés biochimiques de *Lb. plantarum*

Lb.plantarum est nommée pour le premier foie *Streptobacterium plantarum* par Orla-Jennsen en 1919 et renommé *Lb. plantarum* par Pederson (1936) qui a décrit cette espèce en fonction de certaines caractéristiques biochimiques et morphologiques, *Lb. plantarum* fermente généralement les hexoses par la voie l'EMP (Embden-Meyerhoff-Pamas) voie métabolique aboutissant à la formation d'acides D et L-lactique. De plus les pentoses sont

fermentés pour former de l'acide lactique et acétique en présence de phosphocétolase inductible. *Lb. plantarum* possède des déshydrogénases lactiques (LDH) spécifique qui forment le lactate L(+) et D(-) (Melgar-Lalanne *et al.*, 2012).

Les sondes de sucre ont montré que la fermentation des sucres était généralement homolactique avec certaine activité hétéro-lactique (production d'acétate). Les acides organiques tels que le malique l'acétique et l'éthanol peuvent être partiellement métabolisés, entraînant la production de dioxyde de carbone, d'acide lactique et acétique. *Lb.plantarum* à montré diverses réponses pour certains facteurs de stress comme le choc thermique (55°C, 10min), la bil (0,5%), le stress oxydatif (0,1% H₂O₂). pH (2,5), éthanol (10%), sel (7,5% NaCl) et détergent (dodécylsulfate de sodium 0,05%) (Melgar-Lalanne *et al.*, 2012).

I.4.2. L'activité antimicrobienne du *Lb. plantarum*

Selon les données expérimentales, *Lb. plantarum* est actif contre de nombreux agents pathogènes à Gram négatif et micro-organismes responsables de la détérioration des aliments, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, etc. De plus *Lb.plantarum* exerce une activité inhibitrice contre une variété de bactéries Gram-positives potentiellement nocives, *Listeria monocytogenes*, *S.aureus*, etc. Il est important de souligner que l'activité antimicrobiennes de *Lb. plantarum* (et d'autres bactéries lactiques) est spécifique à la souche, c'est-à-dire que seules certaines souches de *Lb.plantarum* sont inhibitrices vis-à-vis de souches spécifiques de l'espèce microbienne. Trois mécanismes pourraient expliquer l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques et de *Lb.plantarum* en particulier : la production de bactériocines ; le rendement en acides organiques et autre substances inhibitrices tels que l'éthanol, le dioxyde de carbone et le peroxyde d'hydrogène ; et la compétition pour les nutriments (Dinev *et al.*, 2018).

I.4.3. Les substances antimicrobiens produire par *Lb.plantarum*

I.4.3.1. Acides organiques

Lb. plantarum est une espèce hétéro-fermentaire facultative qui fermente les glucides en acide lactique et de l'éthanol ou de l'acide acétique. L'activité antimicrobienne des acides organiques est basée sur la réduction de pH local de milieu qui inhibe la croissance des bactéries, sensible aux conditions acide. Le pH rend les acides organiques liposolubles, leur permettant de traverser la membrane cellulaire et d'atteindre le cytoplasme des micro-organismes cible, cependant, les micro-organismes différent. Considérablement dans leur sensibilité à l'acide lactique à pH 5 l'acide lactique exerce une activité inhibitrice vis-à-vis

des bactéries sporulée mais est inefficace contre les levures et les moisissures. Les acides acétiques et propionique produit par la souche de *Lb.Plantarum* par des voies hétéro-fermentaire peuvent interagir avec les membranes cellulaires et provoquer une acidification intracellulaire et une dénaturation des protéines, ils ont une activité

antimicrobienne plus élevé que l'acide lactique en raison de leurs valeurs de pka plus élevé (l'acide lactique 3,08, acide acétique 4,75 et acide propioniques 4,87) et du pourcentage plus élevé d'acide non dissociés que l'acide lactique à un pH donné (Dinev *et al.*, 2018).

I.4.3.2. Peroxyde d'Hydrogène

Peroxyde d'hydrogène est produit par *Lb.plantarum* et les autres bactéries lactiques en présence d'oxygène sous l'action des flavoprotéines oxydases ou NADH peroxydase. L'activité antimicrobienne du peroxyde d'hydrogène pourrait être le résultat de l'oxydation des groupes sulfhydryle provoquant la dénaturation d'un certain nombre d'enzyme, et de la peroxydation des lipides membranaires conduisant à une perméabilité membranaire accrue. Le peroxyde d'hydrogène peut être un précurseur de la production de radicaux super-oxyde, et hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN (Dinev *et al.*, 2018).

I.4.3.3. Le dioxyde de Carbone

Le dioxyde de carbone est principalement produit par les bactéries lactiques hétéro-fermentaire. Parce que *Lb.plantarum* est une espèce hétéro-fermentaire facultative, selon la source de carbone, il peut basculer entre l'utilisation de voies de métabolisme hétéro-fermentaires et homo-fermentaires .le mécanisme précis de l'action antimicrobienne du dioxyde de carbone est encore mal compris cependant , le dioxyde de carbone peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie, qui inhibe les décarboxylations enzymatiques, et son accumulation dans la bicouche lipidique de la membrane est entraînant un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor *et al.*, 2008 ; Dinev *et al.*, 2018). Le CO₂ inhibent efficacement la croissance de nombreux micro-organismes d'altération des aliments, en particulier les bactéries psychrotrophes à Gram négatif (Ammor *et al.*, 2008).

I.4.3.4. Acides grass hydroxylés

Il existe plusieurs études indiquant que les 3 acides gras hydroxy ont une activité antifongique ce qui est dû aux propriétés de type détergent des composés qui modifient la structure de la membrane cellulaire dans les organismes cibles (Dinev *et al.*, 2018).

I.4.3.5. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides ou protéines antimicrobiens synthétisés par les ribosomes. Ils sont omniprésents dans le monde microbien et produits à la fois par des bactéries Gram-positif et Gram négatif, (**Diep et al., 2009**). *Lb. plantarum* produit au moins quatre bactériocines différentes de classe IIB : la plantaricine EF, la plantaricine JK qui est bien étudiée, la plantaricine NC8 et la plantaricine S (**Ekblad et Kristiansen, 2019**). *Lb. plantarum* produit une bactériocine nommée la plantaricine S, qui provoque une dissipation de la force motrice des protons et engendre la libération immédiate des solutés pré-accumulés dans le cytoplasme chez les bactéries sensibles. Cette dernière inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire en formant un complexe avec le lipide II, précurseur du peptidoglycane ce qui induit la lyse cellulaire (**Florez et Mayo, 2018**). Différentes bactériocines de *Lb. plantarum* ont un mode d'action bactéricide et un spectre d'activité antimicrobien diversifié (**Dinev et al., 2018**).

I.4.4. Propriétés probiotiques de *Lb. plantarum*

Au cours des dernières décennies, la consommation de probiotiques a attiré une attention considérable. Selon la FAO/WHO, « les probiotiques sont des micro-organismes viables qui confèrent des avantages/aides à la santé à l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates /compétentes ».

La validité scientifique de *Lb. plantarum* en tant que probiotique a d'abord été évaluée en caractérisant la résistance à la bile et à l'acide (protection) dans le tractus intestinal d'hôtes animaux et humains. De plus, *Lb. plantarum* aide à réduire les symptômes globaux du fardeau de l'infection des voies gastro-intestinales. On pense que les probiotiques adhèrent (*Lb. plantarum*) à des effets bénéfiques sur la santé, en particulier liés à l'inhibition de l'adhésion des pathogènes aux lignées cellulaires intestinales. De plus, *Lb. plantarum* est reconnue comme un probiotique naturel du tractus gastro-intestinal humain et peut diminuer l'absorption intestinale des métaux lourds, réduire l'accumulation de métaux dans les tissus et soulager le stress oxydatif hépatique (**Sudhanshu et al., 2018**). Les avantages potentiels de *Lb. plantarum* en tant que probiotique pour la santé humaine comprennent la régulation du système immunitaire, la réduction du taux de cholestérol. (**Abdelazez et al., 2018**).

I.5. Critères de sélection de souches probiotiques

I.5.1. Le choix des souches microbiennes

La première étape de la sélection des souches microbiennes à usage probiotique ne fait aucun doute : elle doit être représentative des microorganismes généralement reconnus comme sûrs (microorganismes GRAS) (**Havenaar et al., 1992., Gupta et al., 2018**). Tels que les espèces *Lactobacillus* ou certaines espèces *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (*Enterococcus*). L'utilisation d'autres microorganismes est très problématique ; en cas de doute sur l'innocuité d'une souche microbienne, des études toxicologiques à court et à long terme pourraient être nécessaires avant l'acceptation du probiotique (**Havenaar et al., 1992**).

I.5.2. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne contre les germes pathogènes est considérée comme l'un des critères principalement utilisés pour la sélection des souches probiotiques, ces organismes peuvent fonctionner comme des barrières microbiennes contre les pathogènes gastro-intestinaux grâce à l'exclusion compétitive de la fixation des pathogènes, la modulation du système immunitaire de l'hôte et la production des substances antimicrobiennes (**Marianelli et al., 2010**).

Lorsqu'un probiotique est utilisé pour réprimer des microorganismes pathogènes potentiels ou d'autres microorganismes désavantageux chez l'hôte, il serait avantageux que la souche possède des propriétés antagonistes. Les bactéries lactiques, fréquemment utilisées comme probiotiques, possèdent un certain nombre de propriétés antagonistes qui agissent par :

- Diminution du pH par la production d'acide lactique.
- Consommation des nutriments disponibles.
- Diminution le potentiel redox.
- Production de peroxyde d'hydrogène (dans des conditions aérobies). Production de composants inhibiteurs spécifiques, tels que les bactériocines (**Havenaar et al., 1992**).

I.5.3. L'adhésion et colonisation de tissu épithélial intestinal

La capacité d'adhérer aux surfaces intestinales est l'un des critères les plus importants pour la sélection des bactéries probiotiques, car l'adhésion au tissu épithélial intestinal est considérée comme un critère de colonisation et donc de production de bénéfices pour la santé

en tuant les pathogènes nuisibles et en équilibrant l'équilibre du microbiote de TGI (**Gupta et al., 2018**).

Les cellules bactériennes probiotiques doivent adhérer à la muqueuse et, au moins temporairement, coloniser l'iléon, où l'on pense que les probiotiques exercent leurs effets bénéfique, qui dépendent des bactéries adhérant à la muqueuse pendant un temps suffisant (**Ammor et Mayo, 2007**). La colonisation des probiotiques doit attribuer à l'hôte des caractéristiques favorable à la santé, comme la production de vitamines, d'acide aminés, d'enzymes, d'acides lactiques, d'antibiotiques naturels ou de peptides/ composés antimicrobiens (**Gupta et al., 2018**).

Pour une survie prolongée des souches probiotiques dans le tractus gastro-intestinal les microorganismes doivent avoir un temps de génération court et/ ou la capacité de coloniser les surfaces du corps, sinon les souches seront éliminées par les contractions de l'intestin.

En général, l'adhérence et la colonisation sont considérées comme une propriété important des souches probiotiques. L'adhésion peut être considérée comme la première étape de la colonisation. La sélection de souches ayant la capacité d'adhérer aux cellules gastro-intestinal peut être basée sur des tests *in vitro* (**Havenaar et al., 1992**).

I.5.4. Résistance aux conditions *in vivo*

Après administration du probiotique, les microorganismes ne doivent pas être tués par les mécanismes de défense de l'hôte. Selon le site d'administration des microorganismes, ils doivent être résistants aux conditions spécifiques survenant sur où à cet endroit du corps (**Havenaar et al., 1992**). Selon la définition, les bactéries probiotiques doivent survivre, prévaloir et tolérer le milieu de stress tel qu'un faible pH (condition acide) dans l'estomac et une concentration élevée des sels biliaires dans l'intestins grêle, y compris diverses enzymes hydrolytiques (**Gupta et al., 2018**). Cela signifie, par exemple, que les microorganismes d'un probiotique pour l'usage oral doit être résistant aux enzymes de la cavité buccale (par ex. amylase, lysozyme), aux enzymes (pepsine, lipase) (**Havenaar et al., 1992**).

II. Les Staphylocoques

II.1. Historique

Les Staphylocoques furent identifiés à la fin de XIX siècle, l'observation au microscope faisant apparaître des « amas de grains » dans le pus de furoncles. D'abord observé par Robert Koch en 1878, il fut reconnu par Louis Pasteur deux ans plus tard. En 1881,

Alexander Ogston isola la bactérie à partir d'abcès post-opératoires et reproduisit l'infection chez l'animal. Ces amas furent à l'origine du nom qu'il lui donna, *Staphyle* désignant la grappe de raisin en grec. Et ce fut en 1884 qu'Anton Rosenbach cultiva le staphylocoque *in vitro* et en décrivit la première espèce connue : *S.aureus*, ou staphylocoque doré, ainsi nommé en raison de la couleur des colonies obtenues en culture (Pellerin *et al.*, 2009).

II.2. Généralités

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif non mobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas plant de plusieurs éléments (du grec staphylo, grappe de raisin), diamètre moyen 0,8 à 1 μm (Pellerin *et al.*, 2009). Ce sont des aérobies ou des anaérobies facultatif, est ont un métabolisme respiratoire et fermentatif (Bennett *et Monday*, 2003). Elles peuvent se développer dans un large intervalle de température de 7 à 48°C avec un optimum de 30 à 37°C, et un pH de 4,2 à 9,3 avec un optimum de 7 à 7,5 (Yasmine *et al.*, 2015).

II.3. Ecologie et habitat

Les staphylocoques sont largement distribués dans la nature et occupent une variété de niche écologique. L'ensemble des staphylocoques sont aussi isolé à base d'un large éventail de produit alimentaire comme la viande, le fromage, le lait et à partir de source environnementales tell que le sol, le sable, l'air et l'eau. L'habitat principal des staphylocoques est la peau et les muqueuses des humains et des animaux à sang chaud, mais peut également être trouvé dans la cavité buccale, la glande mammaire, l'intestin, les voies respiratoires supérieures et les voies génito-urinaires de l'hôte (Viridiana, 2010).

II.4. Classification

Selon la classification de Garrity *et al.*, (2007) ; *Staphylococcus* appartient au phylum des firmicutes constitué de quatre classe : *Clostridia*, *Mollicutes*, *Bacilli* et *Togobacteria*. La classe des *Bacilli* est constituée de deux ordres : *Bacillales* et *Lactobacillales*, chaque ordres est divisée en quatre familles ; *Staphylococcaceae* constitue la quatrième famille de *Bacillales*, celle-ci comprend un seul genre : *Staphylococcus* (GC% 30-39%). Le genre *Staphylococcus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animal.

La classification du *Staphylococcus* a subi plusieurs révisions successives grâce au développement du séquençage d'ARNr 16S, on distingue plus de quarante espèces de

Staphylococcus. Un certain nombre d'entre elles sont trouvées chez l'homme, d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (viandes, produits laitiers, etc...) (Chaalal, 2019). Parmi les espèces trouvées chez l'homme trois espèces *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*, occupent une position privilégiée, avec peu d'autres espèces impliquées en pathologie humaine. Le genre de staphylocoque est divisé en deux groupes selon la présence de coagulation (Alomar, 2007). Les staphylocoques à coagulase positive, généralement considérés comme pathogènes et les staphylocoques à coagulase négative, réputés moins dangereux (Pellerin et al., 2010).

Le groupe de staphylocoques à coagulase négative, compte 33 espèces dont la plupart ne présente aucun risque pour la santé, telle que *S. xylose*, *S. lentus*, *S. sciuri* isolés de lait ou de fromage (Morea et al., 1999; Blaiotta et al., 2004).

Le groupe de *Staphylococcus* à coagulase positive avec 7 espèces a savoir *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*. Celles-ci peuvent être liées à une infection humaine (Quinn et al., 2011)

II.5. L'espèce *Staphylococcus aureus*

II.5.1. Caractères morphologiques

À l'examen microscopique, les *S. aureus* est une bactérie sphérique à Gram positif, de 1 µm de diamètre, non mobile et asporogènes (Bennett et Monday, 2003). La majorité des souches des *S. aureus* sont capsulées, mais les souches peuvent perdre leur capsule après culture (Pellerin et al., 2009). Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de grappes de raisin. Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chainettes (en générale de 3 à 5 éléments (Chaalal, 2019).

II.5.2. Caractères biochimiques

Toutes les souches des *S. aureus* sont des aéro-anaérobies facultatif, produisent une coagulase, et une catalase positive mais pas d'oxydase (Pellerin et al., 2009). Elles sont : indole -, acétone+, urease+, Vp+, MR +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Chaalal, 2019). *S. aureus* est très tolérant aux concentrations élevées de chlorure de sodium, jusqu'à 1,7 molaire (Plata et al., 2009). *S. aureus* est capable de produire un grand nombre d'enzymes extracellulaires, de

toxines et d'autres composés chimiques. Il a été démontré que *S.aureus* est capable de produire au moins 34 protéines extracellulaires différentes, bien qu'aucune souche de l'organisme ne soit capable de produire toutes ces protéines (**Bennett et Monday, 2003**).

De plus, les souches de *S.aureus* présentant sur des boîtes de gélose au sang, les colonies de *S. aureus* provoquent souvent une hémolyse B (**Plata et al., 2009**).

II.5.3. Caractères culturels

Les souches de *S.aureus* présentent une bonne croissance sur milieux usuels en 18-24 heures à 37°C (**Pellerin et al., 2009**). En générale, se cultivent facilement dans des températures de 7 à 47,8°C avec optimal 35°C, et un pH de 4,5 à 9,3 avec un optimal entre 7,0 à 7,5. L'espèce *S. aureus* est capable de se développer en présence de 7,5 ou 10% de NaCl (**Bennett et Monday, 2003**).

Sur gélose nutritive, les colonies de *S.aureus* sont lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune-orange). En gélose ensemencement en masse, la croissance est observée sur toute la hauteur du tube signant le caractère aéro-anaérobie facultatif. En bouillon, la culture de *S. aureus* forme un trouble uniforme abondant, parfois un dépôt et un voile en surface (**Pellerin et al., 2009**). *S. aureus* à réduire le téllurite de Potassium et hydrolyse le jaune d'œuf à produire des colonies noires, en aérobie et en anaérobie (**Bennett et Monday, 2003**).

L'espèce *S.aureus* peut également être cultivé dans des milieux sélectifs, tels que : milieu Chapman, milieu gélosé hypersalé (7,5% de Na cl) qui contient du mannitol, il permet une culture abondante de *S. aureus* après une incubation de 24-48 heures. Les colonies sont alors entourées d'un halo jaune puisqu'elles fermentent le mannitol (**Chaalal, 2019**).

II.5.4. Les entérotoxines staphylococciques

La plupart des souches de *S.aureus* produisent un ou plusieurs groupes d'exoprotéines spécifiques, qui comprennent les entérotoxines staphylococciques (SE), les toxines exfoliatives staphylococciques (ET) et la toxine 1 du syndrome du choc toxique (TSST-1) (**Cha et al., 2006**).

Les entérotoxines sont des protéines à chaîne unique, qui sont antigéniques avec des poids moléculaires de 26000 à 29000. Ce sont des protéines basiques neutres avec des points isoélectriques de 7 à 8,6 (**Bennett et Monday, 2003**). Les entérotoxines Staphylococciques sont résistantes aux conditions environnementales (congélation, séchage, traitement thermique

et pH faible) qui détruisent facilement la souche productrice de l'entéotoxine. Il sont également résistants aux enzymes protéolytiques conservant leur activité dans le tube digestif après ingestion (**Hennoys et al., 2012**).

Les entérotoxines de *S.aureus* sont de puissantes toxines parentérales synthétisées par *S. aureus*. Leur activité va du nanogramme au microgramme et résiste aux conditions (traitement thermique, pH faible) qui ont tendance à détruire les bactéries et les enzymes protéolytiques qui les produisent, ils restent donc actifs dans le tube digestif après ingestion (**Argudin et al., 2010**).

Les SE peuvent être produites à partir d'une faible charge bactérienne (10^3 UFC/ml) après 2h d'incubation à 37°C. Chez l'humain, les symptômes apparaissent après l'ingestion d'une petite quantité de toxine (0,5ng/ml) (**Chaalal, 2019**).

Les entérotoxines staphylococciques sont à l'origine des toxi-infections alimentaires. Ces dernières ont été classées comme les entérotoxines staphylococciques classiques (SEA à SEE) et les nouvelles entérotoxines (y compris SEG, SEH, SEI et SEJ). Récemment, la famille SE a été élargie suite à la détection d'autres gènes d'entérotoxines dont (SEA, SEB, SECn, SED, SEE et SEH) et TSST-1 sont des membres de la famille des super-antigènes des toxines pyrogènes (PTSAG) (**Cha et al., 2006**). toutes ces toxines présentent une activité de super-antigène en interagissant avec les cellules de prolifération non spécifique des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocyte T stimulés (**Nehal et al., 2010**). Parmi les super-antigènes, seuls les SE ont une activité émétique. L'activité super-antigènes et émétique de la SE sont deux fonction distincts localisés sur des domaines distincts de la protéine (**Danges et al., 2000**).

Parmi les différents métabolites produits par *Staphylococcus*, les entérotoxines présentent le plus grand risque pour la santé des consommateurs. Les entérotoxines sont des protéines produites par certaines souches de *Staphylococcus* qui, si on les laisse se développer dans les aliments, peuvent produire suffisamment d'entérotoxines pour provoquer des maladies lorsque des aliments contaminés sont consommés. Ces protéines structurellement apparentées et toxicologiquement similaires sont principalement produites par *S.aureus*, bien que *S.intermedius* et *S.hyicus* se soient également avérés entérotoxiques (**Bennett et Monday, 2003**).

II.5.5. Toxi-infection alimentaire à *Staphylococcus aureus*

Le lien entre le staphylocoque et les maladies d'origine alimentaire remonte à 1884, lorsque les créatures sphériques du fromage ont provoqué une grave épidémie d'intoxication alimentaire aux Etats-Unis. D'autres épidémies précoces maintenant attribuées à la consommation d'aliments contaminés par le staphylocoque se sont produites en France en 1894, au Michigan en 1907 et aux Philippines en 1914. En 1939 le Dr Gail Duck de L'Université de Chicago et ses collègues ont pu montrer que l'intoxication alimentaire causée par la consommation de génoise avec de la crème contaminée était une toxine produite par un staphylocoque isolé (**Bennett et Monday, 2003**).

S.aureus est le plus connu et fréquemment associé à l'étiologie de diverses infections et de toxi-infection chez l'homme, mais d'autres espèces de staphylocoque peuvent également provoquer des infections opportunistes. Ces infections, salvatrices des infections nosocomiales, mettent parfois en jeu le pronostic vital et nécessitent un traitement adapté (**Pellerin et al., 2009**). *S.aureus* est la cause de toxi-infection alimentaire car il s'agit d'une bactérie productrice de toxine qui produit des toxines thermorésistantes dans les aliments tels que le lait cru. *S.aureus* est détruit par la pasteurisation et produit des entérotoxines qui peuvent résister à la pasteurisation, provoquant des intoxications (**annexe 05**) (**Bentoura, 2018**).

L'intoxication alimentaire staphylococcique est une intoxication causée par la consommation d'aliments contenant des quantités suffisantes d'une ou plusieurs entérotoxines préformées (**Argudin et al., 2010**). Cinq conditions sont nécessaires pour induire des toxi-infections alimentaires : (1) une source contenant des Staphylocoques productrices d'entérotoxines ; matières premières, porteuse saine ou infectée. (2) Transfert de Staphylocoques de la source à la nourriture par exemple des outils de préparation des aliments en raison de mauvaises pratiques d'hygiène. (3) Composition alimentaire avec des caractéristiques physicochimiques favorables pour la croissance de *S. aureus* et la toxinogénèse. (4) la températures favorable et le temps suffisant pour la croissance bactérienne et la production des toxines. (5) l'ingestion de nourriture contenant suffisamment de quantité de toxine pour provoquer des symptômes (des nausées, des vomissements sévères,...) (**Hennoys et al., 2012**).

Les aliments couramment associés à une intoxication alimentaire aux staphylococciques comprennent des catégories générales telles que la viande et les produits à base de viande, les

salades, les produits de boulangerie crémeux et les produits laitiers. bon nombre de ces articles ont été contaminés lors de leur préparation à la maison ou dans des établissements de restauration, puis mal manipulés avant d'être consommés (**Bennett et Monday, 2003**).

Etant donné que l'espèce *S.aureus* n'entre pas en bonne compétition avec le microbiote indigène dans les aliments crus, la contamination est principalement associée à une mauvaise manipulation des aliments cuits ou transformés, suivie d'une contamination bactérienne ou dans des conditions permettant à *S.aureus* de se développer et de produire des entérotoxines. *S.aureus* est également présent dans les aliments salés, comme le jambon, ou il a été également impliqué en raison de sa capacité à se développer à une activité de l'eau relativement faible ($A_w = 0,86$) (**Argudin et al., 2010**).

Bien que la quantité d'entérotoxines excrétées par les souches de *S.intermedius* soit plus faible par rapport aux souches entérotoxogènes *S.aureus* sous-espèce *aureus* ; une fois introduite dans les aliments, *S. intermedius* peut proliférer et excréter suffisamment d'entérotoxines pour être à l'origine d'une toxi-infection alimentaire (**Götz et al., 2006**).

Matériel et méthodes

I. Matériel et 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 23/06/2022.

Le principal objectif de cette étude est l'évaluation *in vitro* de quelques propriétés probiotiques de *Lb. plantarum* et de son pouvoir antagonistes à l'égard de *S.aureus*

I.1. Matériel biologique

Trois souches bactériennes appartenant à la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée(LMA) ont été utilisées lors de cette étude, deux souches de *Lb. plantarum*, conservée à 4°C dans du bouillon MRS. Une souche de bactéries pathogènes appartenant à *Staphylococcus aureus*, conservée à 4°C dans du bouillon nutritive. Le nom des espèces et leurs origines sont portés sur le **(Tableau II)**.

Tableau I : codes et origines des souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes	Code	Origine
<i>Lb. Plantarum</i>	Lb9	Produit lactière (l'ben)
<i>Lb. Plantarum</i>	Lb47	Produit lactière (l'ben)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S.aureus</i>	Souche de référence

I.2. Revivification et purification des souches

La revivification des souches de *Lb. plantarum* et *S.aureus* est effectuée par la réalisation des repiquages successifs dans des tubes de 9ml de bouillon MRS pour *Lb. plantarum*, et de bouillon nutritif pour *S.aureus* puis incubés respectivement à 30°C et 37°C pendant 24 à 48h, Au terme de l'incubation, un repiquage de ces souches est réalisé respectivement sur gélose MRS et gélose Chapman.

Pour la purification des souches, un ensemencement en stries est effectué sur gélose MRS pour les bactéries lactiques et Chapman pour *S.aureus*. Au terme de l'incubation aux températures de croissances respectives, des colonies uniformes et bien distinctes sont obtenues.

I.3. Vérification de la pureté des souches bactériennes

Après des repiquages successifs sur les milieux appropriés à chaque souche, des tests sont réalisés pour vérifier la pureté des deux souches lactiques et la souche pathogène. Ils se résument dans :

- Observation macroscopique de l'aspect des colonies.
- Examen microscopique par coloration de Gram.
- Test de catalase.

I.4. Standardisation des souches bactériennes

A partir des cultures fraîches obtenues après 18h d'incubation dans du bouillon MRS pour *Lactobacillus plantarum* (Lb9 et Lb47) et le bouillon nutritif pour la souche de *Staphylococcus aureus*, un ensemencement en stries est effectué sur gélose MRS pour les souches de *Lactobacillus* et la gélose nutritive pour *S.aureus* puis incubées à 37°C pendant respectivement 48 et 24h. Après croissance, 5 colonies de chaque souche lactique et 2 colonies de la souche pathogène sont mises respectivement dans 9ml de bouillon MRS et milieu BN, par la suite incubé à 37°C pendant 24h. A partir des cultures obtenues, des séries de dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique suivie d'ensemencement en masse de 1ml des dilutions 10^{-8} , 10^{-9} à raison de deux boîtes pour chaque dilution. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 et 24h. Un dénombrement est réalisé après croissance bactérienne.

I.5. Etude de l'activité antibactérienne *in vitro*

I.5.1. Préparation des cultures fraîches

Après l'obtention des colonies de souches *Lactobacillus plantarum* (Lb9 et Lb47) sur gélose MRS et de *S.aureus* sur gélose Chapman, 5 colonies de chaque souches de *Lb.plantarum* sont ensemencées dans 9 ml du bouillon MRS, puis incubées à 30°C pendant 18h à 24h. Deux colonies de *S.aureus* sont inoculées dans 9 ml de bouillon nutritif (BN) puis incubées à 37°C pendant 18h à 24h.

I.5.2. Méthodes directe (Tests de spots)

Pour tester l'activité antibactérienne de l'espèce de *Lb. plantarum* (Lb9 et L47) à l'égard de *S.aureus*, le test des spots a été réalisé.

La méthode décrite selon (Alegria *et al.*, 2010) a été appliquée :

- Des cultures fraîches de 18h à 24h des souches *Lactobacillus plantarum* Lb9 et Lb47 sont déposées en spots sur la surface du milieu MRS solide.
- Les boîtes sont séchées près du bec benzène pendant 30 min puis incubées à 30°C pendant 48h.
- Ensuite, les spots sont recouverts d'une couche de 9 ml d'une gélose Mueller-Hinton (MH) en surfusion ensemencée avec 1 ml (10^7 UFC/ml) d'une culture fraîche de 18h à 24h de la souche indicatrice *S.aureus*.
- Après solidification du milieu, les boîtes de pétri sont incubées à 30°C pendant 24h.
- L'apparition d'une zone claire autour des spots détermine l'inhibition par la souche lactique (**Figure 01**).

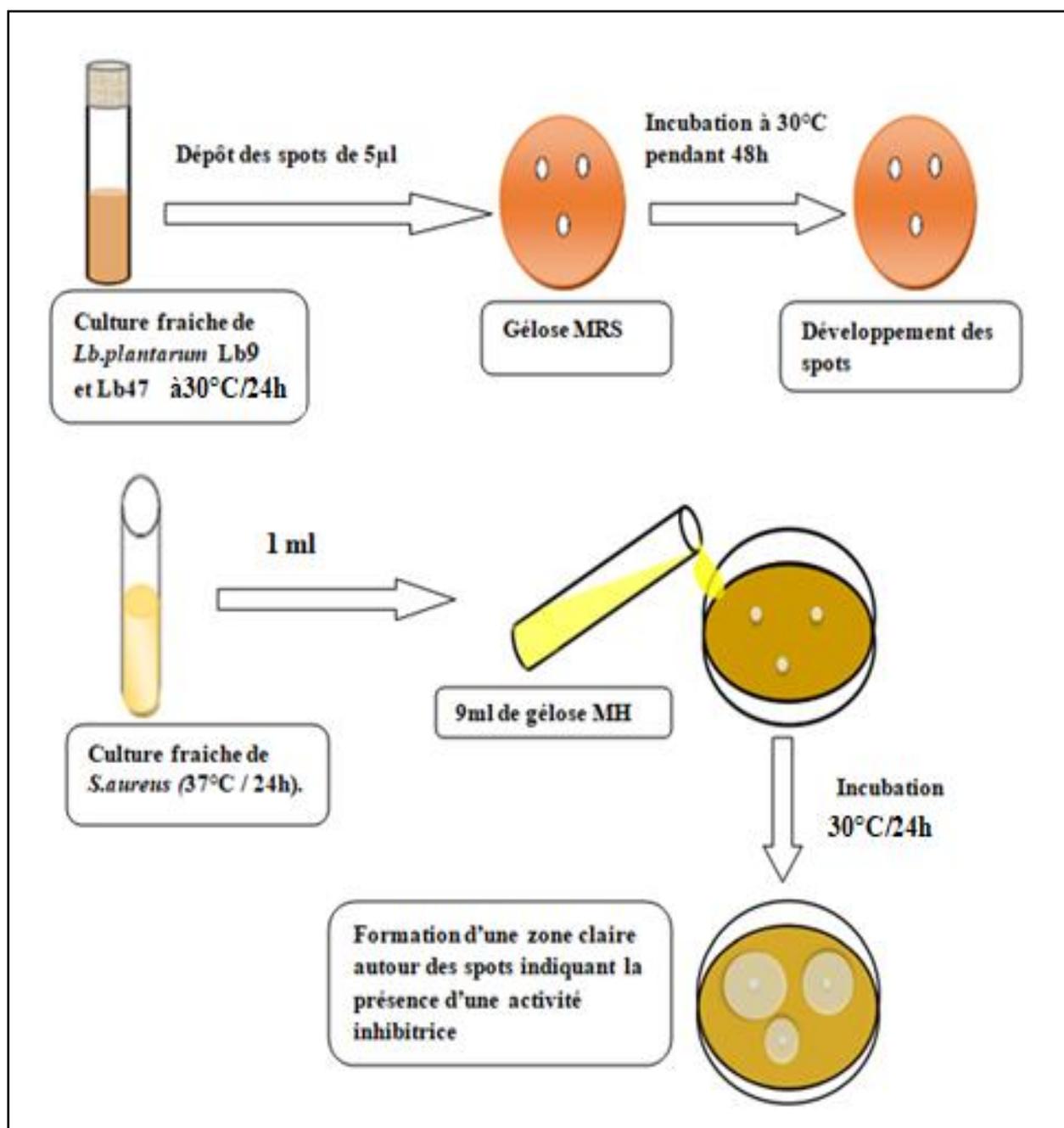


Figure 01 : Schéma illustrant les étapes du test des spots.

I.5.3. Méthode indirecte (Tests des puits)

La méthode décrite par (Mami *et al.*, 2010) est appliquée avec certaines modifications : la méthode indirecte permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique (*Lb. plantarum*) productrice de substances antimicrobiennes avec la souche test.

- Les souches sont cultivées dans du bouillon MRS et incubées pendant 18 h à 30°C.
- après l'incubation, la culture fraîche de 18h est centrifugée (6000 tr/min, 20min à 4°C).
- Dans une boîte de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (MH) solide et ensemencée à raison de 10^7 UFC/ml par la souche test (*S.aureus*), des puits sont creusés.
- Ensuite les puits sont remplis avec 50µl du surnageant brut de la culture lactique à tester (*Lb. plantarum*).
- Les boîtes sont incubées à 4°C pendant 2h pour permettre une meilleure diffusion des substances actives puis à 30°C pendant 24h.

Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive (Mami *et al.*, 2010). (Figure 02)

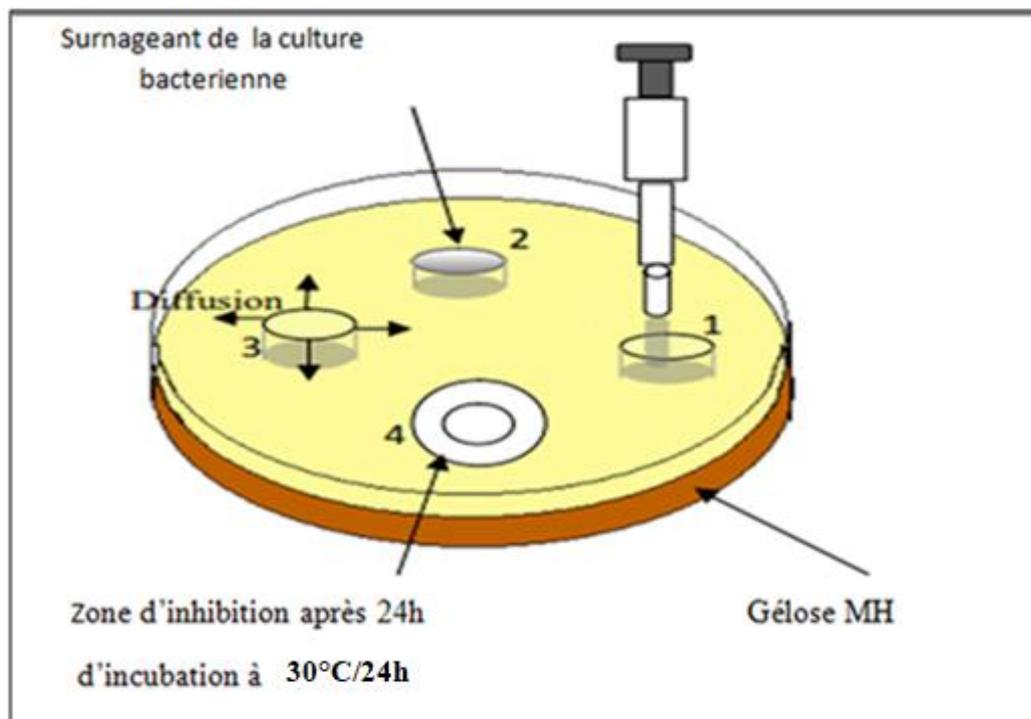


Figure 02: Schéma illustrant la méthode de diffusion en puits.

Un ajustement du pH à 6,8 du surnageant de culture afin d'éliminer l'effet du pH et de l'acidité a été réalisé. Le test des puits a été effectué comme précédemment

I.6. Potentiel probiotique de *Lb.plantarum*

I.6.1 Résistance aux sels biliaires

Le protocole décrit par (**Hyronimus *et al.*, 2000**) est appliqué avec quelques modifications. Les cultures fraîches de 18h des deux souches de *Lb.plantarum* Lb9 et Lb47 ont été centrifugées à 6000tr/20min à 4°C et les culots obtenus ont été inoculés dans 9ml de bouillon MRS additionné de 0,3% de sels biliaires, puis incubés à 30°C/ 0h, 1h, 2h et 3h puis 24h. Pour déterminer le nombre de cellules viables après les 3h d'incubation, une série de dilutions décimale jusqu'à 10^{-8} UFC/ml a été effectuée, puis 1ml des dilutions 10^{-6} , 10^{-7} UFC/ml et 10^{-8} UFC/ml sont ensemencé en masse sur gélose MRS. Après 48h d'incubation à 30°C un dénombrement est effectué.

I.6.2. Résistance à acidité

Ce test a été évalué selon la méthode décrite par (**Maragkoudakis *et al.*, 2006**) avec quelques modifications. La culture fraîche des deux souches Lb et Lb 47 de 18h à été centrifugée (6000 tr/20min). Les culots obtenus sont inoculés dans 9ml de MRS dont le pH est ajusté à 2 par une solution de HCl. De 1N puis incubés à 30°C pendant 3 h. La viabilité des bactéries est déterminée par dénombrement sur gélose MRS après 48h d'incubation.

I.6.3. Adhésion sur microplaque en polystyrène

La formation de biofilms est testée sur la microplaque en polystyrène stériles suivant la méthode (**O'Toole *et al.*, 1999**), avec quelques modifications.

- Les puits de la microplaque, déjà remplis avec 100 µl de bouillon TSB, sont ensemencés en triple exemplaires (trois répétition par souche dans la même microplaque) avec 100 µl d'une suspension bactérienne fraîche de 18 h.
- puis la microplaque est incubée à 37°C pendant 24 h.
- six puits contenant 200 µl de bouillon TSB sont utilisés comme témoins.
- Après incubation les suspensions bactériennes, dans les puits, sont aspirées soigneusement puis ces derniers sont rincés deux fois avec l'eau distillée.
- Les cellules adhérentes sont fixées avec 200 µl d'éthanol à 96% pendant 15 minutes, puis l'éthanol est aspiré et les puits sont laissés sécher stérilement.

Matériel et méthode

- Ensuite les cellules fixées sont colorées avec 200 μ l d'une solution de Crystal violet pendant 15 minutes sous agitateur électrique.
- Puis, lavées avec 200 μ l d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'une couleur claire du liquide du lavage.
- Enfin le colorant fixé aux cellules est solubilisé en ajoutant 200 μ l d'éthanol à 96%.
- La solution obtenue dans chaque puits est transférée dans une cuve de spectrophotomètre et la quantité de colorant fixée (indirectement la quantité de cellules fixées) est estimée par la mesure de l'absorbance à 630 nm.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Revivification et purification des souches

II.1.1. Aspect macroscopique des Lactobacilles en milieu liquide et solide

Après 24h d'incubation dans le milieu liquide, le bouillon MRS apparaît dense et un trouble homogène avec un dépôt au fond de tube qui caractérise le groupe des bactéries lactiques.

(Figure 03)

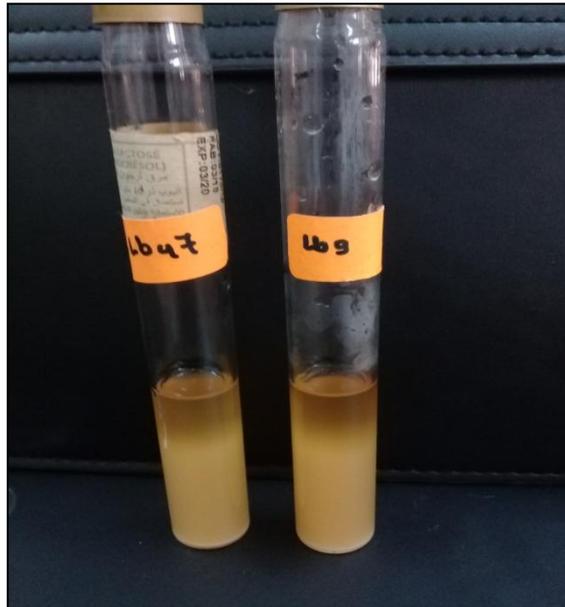


Figure 03 : Aspect de la culture de *Lb.pluntarum* dans le bouillon MRS.

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**).

Sur gélose MRS, les colonies des deux souches Lb9 et Lb 47 apparaissent de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, de couleur blanchâtre. (**Figure 04**)

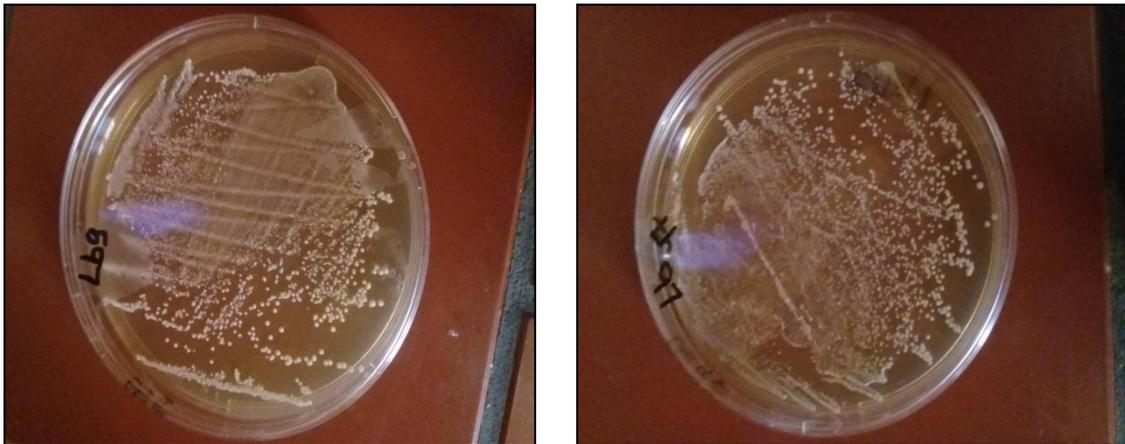


Figure 04: Aspect macroscopique des souches Lb9 et Lb 47 sur gélose MRS.

La croissance des souches de *Staphylococcus aureus* se manifeste par la présence de troubles dans les tubes de bouillon nutritif ensemencés.

Sur gélose Chapman le *Staphylococcus aureus* apparaît sous forme de colonies de grande taille, de couleur jaune avec virage de couleur du milieu vers le jaune qui est dû à la dégradation de mannitol (**Figure 05**).



Figure 05 : Aspect macroscopique de *S.aureus* sur gélose Chapman.

II.1.2. L'examen microscopique

Cette observation microscopique permet de classer les bactéries selon le Gram, la forme cellulaire et mode d'association.

Les résultats d'observations microscopiques révèlent que toutes les souches sont à Gram positif (couleur violet), présentes sous forme de bacilles plus ou moins longs, disposées en chaînes, en paires ou en cellules individuel simple.

Cependant *Staphylococcus aureus* sont à Gram positif est présentés sous forme de cocci disposés en amas, en grappe de raisin.

II.2. Standardisation des souches

Les résultats de la standardisation ont révélé que 5 colonies des deux souches de *Lactobacillus plantarum*, prélevées sur gélose MRS (48h/30°C) donnent en moyenne 33×10^9 UFC/ml.

II.2. Etude de l'activité antimicrobienne *in vitro*

II.3.1. Tests des spots

Pour évaluer l'activité inhibitrice de *Lb. plantarum* a l'égard de *S.aureus* un test des spots à été réalisé.

Les résultats obtenus ont montré que les deux souches de *Lactobacillus plantarum* Lb9 et Lb47 possèdent un spectre d'activité très large à l'égard de *Staphylococcus aureus* qui se traduit par l'apparition de zones d'inhibitions autour des spots de 20 à 25mm de diamètre (Figure 06).

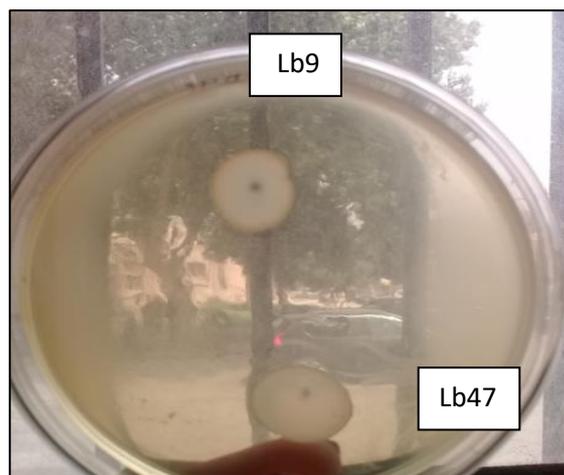


Figure 06: Exemple de résultats obtenu par test de spot à l'égard de *S.aureus*.

Les zones d'inhibitions mesurées varient entre 20 et 25 mm de diamètre (**Tableau III ; Figure 08**). La meilleure activité inhibitrice est notée avec la souche Lb 47 avec une zone d'inhibition de 25mm de diamètre vis-à-vis de la souche pathogène (*S.aureus* p).

Cette activité inhibitrice est dû principalement à la compétition vers les nutriments, la diminution du pH suite à la production des acides organiques tels que l'acide lactique et acétique, d'autres composés tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est considéré comme l'agent majeur de l'activité antimicrobienne des lactobacilles, mais aussi d'autres composés tels que les bactériocines (**Salminen et al.,2004 ; De Vuyst et Leroy, 2007**).

Tableau II : Résultats d'activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* vis à vis *S.aureus* avec test de spots.

Code des souches	Diamètres des zones d'inhibitions en mm				La moyenne
	<i>S.aureus</i>		<i>S.aureus</i>		
	premier essai		2eme essai		
Lb9	21mm	22mm	20mm	20mm	21,5mm
Lb 47	20mm	24mm	24mm	25mm	23,2mm

Les études de (**Fernandez et al., 2003**) démentirent que les souches de *Lactobacillus* sont capables d'inhiber la croissance de certains pathogènes. Cependant, **Mami et al., (2010)** ont démontré l'activité antagoniste de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Min Hsiu et al.,(2016) ont déjà confirmé l'activité antagoniste de *Lactobacillus plantarum* vis-à-vis des bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*.

(**Mami et al., 2010**) montre que la souche de *Lb. plantarum* a donné une zone d'inhibition remarquable vis à vis de *Staphylococcus aureus*, et que cette inhibition est due à une substance inhibitrice.

II.3.2. Test des puits

Pour la recherche de l'activité inhibitrice dans le surnageant de culture des souches lactiques, la méthode de diffusion en puits a été effectuée.

Les deux souches de *Lactobacillus plantarum* présentent un effet antibactérien vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, des zones d'inhibitions de diamètres allant de entre 6 et 11mm sont obtenues (**figure 07**)

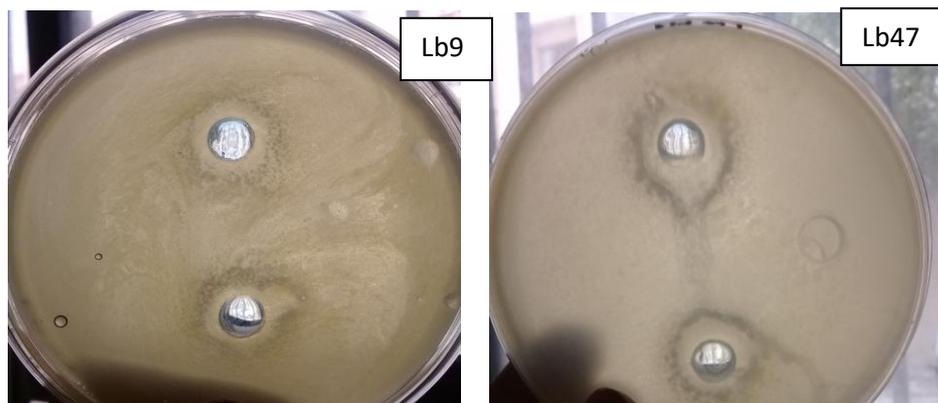


Figure 07 : exemple de résultats obtenus par test des puits vis-à-vis de *S.aureus*

La meilleure zone d'inhibition a été enregistrée avec la souche Lb9 avec un diamètre de 11mm (**Tableau III ; figure08**).

Tableau III : Activité anti- *S.aureus* des surnageants de *Lactobacillus plantarum*

Code des souches	Diamètres des zones d'inhibitions en mm				La moyenne
	<i>S.aureus</i>				
	premier essai		2eme essai		
Lb9	10mm	6mm	8mm	11mm	8,75mm
Lb 47	10mm	7mm	10mm	10mm	9,2mm

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont montré que les souches de *Lactobacillus* tels que *Lactobacillus plantarum* sont capables d'empêcher la

croissance des germes pathogènes Gram-positif et Gram-négatif tels que *Staphylococcus aureus* (Darsanaki *et al.*, 2012 ; Jabbari *et al.*,2017 ; Dinev *et al.*, 2018)

Darsanaki *et al.*(2012) ont rapporté que cette activité inhibitrice pourrait être attribuée à la production de divers composés tels que les acides organiques, diacétyl, peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Les bactériocines sont l'un des composants antimicrobiens importants qui sont libérés de manières extracellulaire par certaines bactéries lactiques et indiqués généralement des activités inhibitrices à l'égard des bactéries Gram-positives étroitement liées (Jabbari *et al.*, 2017).

II.3.3. Tests des puits après neutralisation des surnageants

Après l'élimination de l'effet de l'acidité dans le surnageant par NaOH 1N stérile jusqu'à un pH de 6,8 le test de puits est réalisé.

Les résultats d'activité inhibitrice du surnageant neutralisé de *Lactobacillus plantarum* montrent une activité inhibitrice positive pour la souche Lb47 avec une valeur moyenne des diamètres des zones d'inhibitions de 2,1mm vis-à-vis de *S.aureus*. Cependant aucune zone d'inhibition n'a été observée pour la souche Lb9 ce qui peut confirmer que l'activité inhibitrice de cette souche est due essentiellement à la production d'acides. Les résultats obtenus sont résumés dans le (Tableau IV ; figure08).

Tableau IV : Activité inhibitrice des surnageants neutralisé de *Lb.plantarum* vis-à-vis de *S.aureus*.

Les souches	Diamètres des zones d'inhibitions en mm				La moyenne
	<i>S.aureus</i>				
	premier essai		2eme essai		
Lb9	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
Lb 47	1mm	2mm	1,5mm	5mm	2,37mm

La présence d'activité inhibitrice pour le surnageant neutralisé de la souche Lb47 peut confirmer que cette souche est capable de produire des métabolites à activité antibactérienne autres que les acides organiques.

L'apparition de l'activité antagoniste chez la souche Lb47, après élimination de l'effet de l'acide lactique par la neutralisation, confirme l'existence des autres substances inhibitrices telles que le peroxyde d'hydrogène, diacétyl et les bactériocines (**Titiek *et al.*, 1996 ; Allouche *et al.*, 2010**)

L'absence d'activité inhibitrice du surnageant neutralisé avec la souche Lb9 peut confirmer que l'activité inhibitrice de cette souche est due essentiellement à la production d'acide lactique.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de **Guo *et al.*, (2010)**, qui ont montré que l'activité antimicrobienne a diminué de manière significative après la neutralisation du surnageant et une absence d'inhibition vis-à-vis des pathogènes testés à pH 6,0.

La différence de l'activité inhibitrice dans les même conditions de pH pourrait être causée par certains acides non dissociés ou certaines substances antimicrobiennes (telles que les bactériocines).

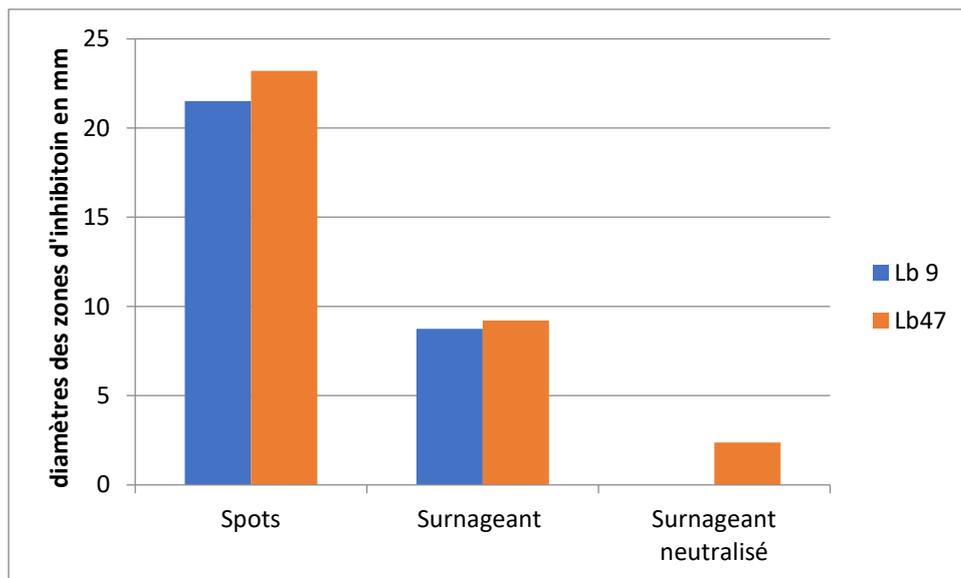


Figure 08 : Résultats de l'activité inhibitrice de Lb9 et Lb47 vis-à-vis de *S.aureus* (test des spots et puits).

II.4. Propriétés probiotiques

Les critères de sélection comprennent la capacité de survivre et de coloniser le tube digestif

II.4.1 Résistance aux sels biliaires

La tolérance à la bile est actuellement considérée comme un critère de base pour sélectionner les souches probiotiques potentielles (**Ren et al., 2014**). Les concentrations physiologiques pertinentes de la bile humaine se situent entre 0,3 % à 0,5 % (**Dunne et al., 1999 ; Dunne et al., 2001 ; Ren et al., 2014**).

D'après les résultats obtenus, les deux souches de *Lb.plantarum* Lb9 et Lb47 ont montré une très bonne résistance à 0,3 % de sels biliaires pendant les 3h d'incubation (33×10^9 UFC/ml) et après 24h d'incubation. Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Ren et al., (2014)** qui montrent que le nombre résiduel de cellules de *Lactobacillus* survivantes était supérieur à 10^8 UFC/mL après 24 heures d'incubation à 0,3 % de sels biliaires.

Ces souches de *Lb.plantarum* testées présentaient une bonne survie dans l'environnement simulant les conditions du duodénum à une concentration de 0.3%.

Selon **Tannock et al., (1989)** la capacité des lactobacilles à survivre en présence de la bile peut être dû à la capacité des souches de produire la bile hydrolase (BSH), L'hydrolase bile-sel est l'enzyme responsable de la déconjugaison de l'acide biliaire. La déconjugaison des sels biliaires peut contribuer à réduire le taux de cholestérol (**Du toit et al., 1998**).

L'évaluation de la tolérance à la bile des souches de LAB est importante lors de la sélection de probiotiques car les souches les plus tolérantes à la bile sont les plus aptes à soulager les symptômes de l'intolérance au lactose (**Ren et al., 2014**)

Guo et al., (2010) dans leurs études a révélé que les sels biliaires à 0,3% n'ont pas montré d'effet létal sur tous les isolats lactiques .et la plupart d'entre eux se sont même développés en présence de 1,0 % de sels biliaires.

Song et al., (2015) ont révélé une tolérance et une croissance de certaines souches de *Lactobacillus spp* testés sur MRS avec 0,3 % de sels biliaires.

II.4.2. Résistance au pH simulé gastrique

Après 3 h d'exposition à pH2, les deux souches de *Lb.plantarum* testées étaient résistantes et se traduit par une survie presque de 100% pendant les 3h et après 24h (10^9 UFC/ml)

La résistance à des conditions d'acidité gastrique dont le pH peut varier entre 1 et 4,5 est l'un des caractéristiques importantes d'une bactérie lactique à effet probiotiques. **Maragkoudakis et al., (2006)** ont étudiés le potentiel probiotique de *Lactobacillus* isolé des produits laitiers, l'étude de la résistance de ces bactéries à un pH entre 1 et 3 a révélé que la totalité des souches sont résistantes à pH 3 pendant 3h, et la plupart ont perdu leur viabilité après 1 h dans un pH 1.

Les études de **Ren et al., (2014)** ont révélé que les huit souches de *Lactobacillus* étudiées pour leur potentiel probiotique ont toléré à la fois le pH 2 pendant 3 heures, où le taux de *Lactobacillus* avoisinait 10^8 UFC/ml après 3 heures d'incubation. Ces résultats sont en accord avec nos résultats où un taux de 10^9 UFC/ml est obtenu.

Selon **Song et al., (2015)** Le terme « probiotique » signifie « pour la vie » et décrit les micro-organismes qui survivent au passage dans le tractus gastro-intestinal et ont des effets bénéfiques sur l'hôte. Les souches tolérantes aux acides ont l'avantage de survivre dans les conditions de pH acide de l'estomac (pH 2,0), où les acides chlorhydrique et gastrique sont sécrétés.

II.4.3. Test d'adhésion sur microplaque polystyrène

Les valeurs d'absorbance à 630 nm (A_{630}) sont considérées comme un indice de l'adhésion bactérienne à la surface interne des microplaques et la capacité des bactéries à former des biofilms.

Selon la méthode de **Mathur et al., (2006)**, Les souches sont classées dans quatre catégories: non-adhérents, faiblement adhérents, moyennement adhérents et fortement adhérents (**Tableau V**)

Tableau V : Classification de l'adhésion bactérienne.

Valeur de l' A_{570}	Adhésion /formation de biofilms
$A \leq 0,07$ témoin négatif	Absente
$0,14 \geq A > 0,07$	Faiblement adhérente
$0,28 \geq A > 0,14$	Modérée
$A > 0,28$	Fortement adhérente

Les résultats obtenus ont montré que les deux souches de *Lb.plantarum* ont adhéré dans la microplaque. Cependant, la souche Lb9 a montré une meilleur adhésion et une forte formation de biofilms (**tableau 0I, annexe 06**)

Selon **Salas-Jara et al., (2016)**, la formation de biofilms par des bactéries probiotiques, telles que *Lactobacillus* spp. est considérée comme une propriété bénéfique. Car elle pourrait favoriser la colonisation et une plus longue persistance dans la muqueuse de l'hôte, en évitant la colonisation par des bactéries pathogènes. La capacité de *Lactobacillus* de former des biofilms sur des surfaces abiotiques (verre ou polystyrène) a été étudiée au cours des dernières années, et les résultats indiquent que seules certaines souches ont cette propriété. Il a également été démontré que l'EPS produite par certaines souches formant des biofilms est capable d'inhiber la formation de biofilms par certaines bactéries pathogènes.

Conclusion

Conclusion

Lors de cette étude deux souches de *Lactobacillus plantarum* (Lb9 et Lb47) isolées à partir de produits laitiers (L'ben) ont été utilisées. L'objectif principal de ce travail est l'étude de l'activité antagoniste de *Lactobacillus plantarum* (Lb9 et Lb 47) à l'égard d'une souche pathogène *Staphylococcus aureus*, et aussi d'évaluer *in vitro* quelques propriétés probiotiques de ces souches lactiques telle que la résistance aux sels biliaires, aux pH simulé gastro-intestinal et l'adhésion sur la microplaque polystyrène.

Les résultats des tests d'activité antimicrobienne (test de spots) montrent que les deux souches de *Lb.plantarum* possèdent un spectre d'activité antibactérien important vis-à-vis de *S.aureus* respectivement de 23,2mm pour Lb47 et 21,5mm pour Lb9. Cette dernière est maintenue après neutralisation des surnageant, en effet des zones de 0mm pour Lb9 et 2,37mm pour Lb47 sont obtenues. Ces résultats indiquent que cette activité n'est pas due uniquement aux acides mais probablement à d'autres substances telle que les bactériocines.

Les deux souches de *Lb.plantarum* montrent une résistance aux conditions gastriques simulées de l'acidité (pH 2) et ainsi qu'à une concentration de 0,3% des sels biliaires pendant les 3 h et après 24h d'incubation avec des taux de survis qui avoisines les 100%. Une capacité d'adhérer fortement sur microplaque polystyrène et de former de biofilms a été notée.

A travers les résultats obtenus dans cette étude on peut suggérer que les deux souches testées de *Lactobacillus plantarum* montrent un grand potentiel probiotique qui les rends de bon candidats pour des applications en tant que probiotiques et bioconservateurs dans les aliments.

Les résultats de notre étude permettent d'ouvrir des perspectives, pour compléter ce travail, serait judicieux de :

- Confirmer les résultats obtenus par une troisième répétition
- Déterminer l'origine de l'activité antibactérienne
- Effectuer le test d'adhésion sur les cellules intestinales
- Etude d'autres critères probiotiques comme la résistance aux antibiotiques.

*Références
bibliographiques*

« A »

- **Abdelazez, A., Abdelmotaal, H., Zhu, Z. T., Fang-Fang, J., Sami, R., Zhang, L-J., Al-Tawaha, A. R. et Meng, X-C. (2018).** Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Advances in Environmental Biology*, 12 (1), 16- 27.
- **Alcamo, I. E. (1996).** Microbiology. Cliffs notes, Inc, Lincoln, Neb, 243pp.
- **Allouche, F. N., Hellal, A., et Laraba, A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature & Technologie*, 13-20.
- **Alomar, J. (2007).** Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* pour maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. **Thèse doctorat**, Institut national polytechnique de lorraine, Français, 206p.
- **Al-Tawaha, R. et Meng, C. (2018).** Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: a review. *Advances in Environmental Biology*, 12(1), 16-27.
- **Ammor, M.S. et Mayo, B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as Functional starter cultures in dry sausage production. *Meat Science*, 76, 138- 146.
- **Ammor, M. S., Tauveron, G., Dufour, E., et Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(2), 454 - 461.
- **Arasua, M., Al-Dhabi, N., Ilavenil, S., Ki Choon, C. et Srigopalram, S. (2016).** *In vitro* importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), 6-10.
- **Argudin, M. A., Mendoza, M. C. et Rodicio, M. R. (2010).** Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Department of functional biology (section of microbiology) and university institute of biotechnology of Asturias (IUBA), university of Oviedo, Spain. 2, 1751-1773.

« B »

- **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. C, Biotechnologies, 0 (23), 30-37.
- **Barrangou, R., Laitinen, S. J., Ibrahim, F. et Ouwehand, A. C. (2011).** Genus lactobacillus, in: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Wright, A.V. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, fourth Edition. CRC Press, 77-92pp
- **Behera, S. S., Ray, R. C. et Zdolec, N. (2018).** *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. BioMed Research International, 1–18.
- **Bennett, R. W. et Monday, S. R. (2003).** *Staphylococcus aureus* in Marianne D. M., Jeffrey W. B., International Handbook Of Food Borne Pathogens, Marcel Dekker, INc, New York. Basel, 41-60pp.
- **Bentoura, S.A. (2018).** L'étude des propriétés technologiques et antagonistes des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chamelle (*Capra hircus*) vis-à-vis de certains contaminants pathogènes pour une utilisation en industrie alimentaire. **Thèse de doctorat**, Ecole nationale supérieure agronomique. Science et qualité des aliments, El Harrach – Alger, 132pp.
- **Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. et Parente, E. (2004).** Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. Journal of Applied Microbiology, 97, 271-284.

« C »

- **Carr, F. J., Chill, D. et Maida, N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey, critical reviews in microbiology, 28 (4), 281- 370.
- **Chaalal, W. (2019).** caractérisation moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de denrées alimentaire. **Thèse de doctorat**, université d'Oran 1 Ahmad ben Bella. Faculté des sciences de la nature et de la vie, Oran, 84pp.
- **Cha, J. O., Lee, J. K., Jung, Y. H., Yoo, J. I., Park, Y. K., Kim, B. S. et Lee, Y. S. (2006).** Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. Journal of applied Microbiology. 101, 864-871.

« D »

- **Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000).** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 16–34.
- **Darsanaki , R., Rokhi, M., Morteza., Aliabadi, A. et Issazadeh, K. (2012).** Antimicrobial Activities of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fresh Vegetables. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11(9), 1216-1219.
- **Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C. et Nes, I. F. (2009).** An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *lactobacillus plantarum*, peptides, 30 (8), 1562-1574.
- **Dinev,T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D. et Styanova, A. (2018).** Antimicrobial activity of *lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: A review, *Bulgarian journal of veterinary medicine*, 21(3), 253-286.
- **Du Toit, M., Franz, C. M. A. ., Dicks, L. M. ., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., ...et Holzapfel, W. (1998).** Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 93–104.
- **Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O’Mahony, L., O’Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O’Sullivan, G. C., Shanahan, F. et Collins, J. K. (1999).** Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 279-292.
- **Dunne, C., O’Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O’Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O’Sullivan, G. C., Shanahan, F. et Collins, J. K. (2001).** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 386S-392S.

« E »

- **Ekblad, B. et Kristiansen, P. E. (2019).** NMR structures and mutational analysis of the two peptides constituting the bacteriocin plantaricin S. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.

« F »

- **Florez, A. B. et Mayo, B. (2018).** Genome analysis of *Lactobacillus plantarum* LL441 and genetic characterisation of the locus for the lantibiotic plantaricin C. *Frontiers in microbiology*, 9(1), 1- 11.

« G »

- **Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R, Harrison, S. H., Euzéby, J. et Tindall, B. J. (2007).** Taxonomic outline of the bacteria and archaea, release 7.” Part 9- the Bacteria: phylum “firmicutes “: class “Bacilli.
- **Guo, X.-H., Kim, J.-M., Nam, H.-M., Park, S.-Y. et Kim, J.-M. (2010).** Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321–326.
- **Götz, F., bannerman, T. et Schleifer, K-H. (2006).** The genera *Staphylococcus* and *macrococcus*. *The prokaryotes: volume 4 Bacteria: Firmicutes, cyanobacteria*, 5-75.
- **Gupta, R., Jeevaratnam, K. et Fatima, A. (2018).** Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health: a review. *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 5(10), 411-424.

« H »

- **Halász, A. (2009).** lactic acid bacteria, In: Lasztity, R. *Food quality and standards- volume III*, Vol 13, EOLSS publishers/ UNISCO, United Kingdom, 71- 72 pp.
- **Hammes, W. P. et Vogel, R. F. (1995).** The genus *lactobacillus*, In: Wood, B. J .B and Holzapfel, W. H. *The genera of lactic acid bacteria volume II*, Springer, vol 2, Boston, MA, 19-54 pp.
- **Havenaar, R., Brink, B. T. et Huis In’t Veld, J. H. J. (1992).** Selection of strains for probiotic use, In: Fuller, R. *Probiotics*, Springer Netherlands, Dordrecht, 209- 224.
- **Hennoys, J., D. Buyser, M. et Dragacci, S. (2012).** *Staphylococcus aureus* and Its Food Poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 36, 815-836.
- **Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A. et Deschamps, A. (2000).** Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61(2-3), 193–197.

« J »

- **Jabbari, V., Khiabani, M., Mokarram, R. R., Hassanzadeh, A. M., Ahmadi, E., Charenaghadeh, S., Karimi, N., et Kafil, H. S. (2017).** *Lactobacillus plantarum* as a probiotic potential from kouzeh cheese (traditional Iranian cheese) and its antimicrobial activity, *probiotics and antimicrobial proteins*, 9 (2), 189-193.

« L »

- **Le Loir, Y., Pellerin, J. L. et Gautier, M. (2009).** taxonomies et habitat, in : Le loir, Y, Gantier, M.(eds.), *Staphylococcus aureus*, Editions Tec & Doc Lavoisier, 1-64pp.

« M »

- **Mami, A., Amine, R.H., Henni, J.E., Kerfouf, A. et Kihal, M. (2010).** Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. *Les technologies de laboratoire*, 5(21), 26- 33.
- **Maragkoudakis, P. A., Zoumpoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot. B. et Tsakalidou, E. (2006).** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16 (3),189-199
- **Marianelli, C., Cifani, N., et Pasquali, P. (2010).** Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*, 161(8), 673–680 .
- **Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T. et Rattan, A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24, 25-9
- **Melgar-Lalanne, G., Rivera-espinoza, Y. et Hernandez, H. (2012).** *Lactobacillus plantarum*: An overview with emphasis in biochemical and healthy Properties, In: Campos, A.I.P, and Mena, A.L. *lactobacillus: classification, Uses and health implications*. Nova science publishers Incorporated, 1-31.
- **Mokoena, M. P., Mutanda, T., Ademola, O. et Olaniran. (2016).** Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Nutrition Research*, 3-4.

Références bibliographique

- **Morea, M., Baruzzi, F. et Cocconcelli, P. (1999).** Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 574-582.

« O »

- **O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B. et Kolter, R. (1999).** Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology*, 91–109.

« P »

- **Plata, K., Rosata, A. E. et Wegrzyn, G. (2009).** *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*, 56 (4), 597-612.
- **Preedy, V. R. (2010).** Bioactive foods in promoting health: Probiotics and prebiotics. Academic Press, 638p.

« Q »

- **Quinn, P.J., Markey, B., Leonard, F.C., Hartigan, P., fanning, S. et Fitzpatrick, E. I. (2011).** *Veterinary Microbiology and Microbial disease*. John Wiley & Sons, USA, 925p

« R »

- **Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., ... et Jin, N. (2014).** *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30, 1–10.
- **Rodríguez-Huezo, M. E., Estrada-Fernández, A. G., García-Almendárez, B. E., Ludeña-Urquizo, F., Campos-Montiel, R. G. et Pimentel-González, D. J. (2014).** Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 768-773.

« S »

- **Salas-Jara, M., Ilabaca, A., Vega, M. et García, A. (2016).** Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35.
- **Salminen, S., Wright, A. V. et Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria: microbiological and functional Aspects. CRC Press, Inc., U.S.A. 658pp

Références bibliographique

- **Shah, N., Patel, A., Ambalam, P., Holst, O., Ljungh, A. et Prajapati, J. (2016).** Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in co-culture. *Annals of Microbiology*, 66 (3), 1137–1143.
- **Song, M., Yun, B., Moon, J. H, Park, D. J., Lim, K. et Oh, S. (2015).** Characterisation of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics. *korean journal of food science animal resource*, 35 (4), 551-556.
- **Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G. et Massa, S. (2002).** Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 35 (5), 370–374.
- **Šušković. J., Kos .B., Beganović. J., Leboš Pavunc.A., Habjanič. K. et Matošić. S (2010).**Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (3), 296–307.

« V »

- **Viridiana. S. (2010).** identification des staphylocoques, streptocoques et entérocoques par des méthodes génotypiques. Faculté des études supérieures de l'Université Laval.

« Y »

- **Yasmine, S. et Djamilia, S. (2015).** Essai de mise au point d'un fromage frais au lait de chèvre associé à *Lactococcus lactis*, doué d'activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée, université Abderrahmane Mira-Bejaïa, 205p.

« Z »

- **Zhang, Y., Suyun, C., Ding, G., Zhu, M., Xuexia Pan. et Zhang, L. (2011).** Molecular analysis and antibiotic resistance investigation of *Staphylococcus aureus* isolates associated with Staphylococcal food poisoning and nosocomial infections African, *journal of Biotechnology* Vol. 10 (15), 2965-2972
- **Zuel-fakkar, N. M. et El-Shokry, M. H. (2010).** Study of Erythroderma and Psoriasis Exacerbation by Staphylococcal Superantigenes. *J. Egypt women Dermatol Soc*, 7, 113-117.

Annexe 01 : Matériel utilisé

1. Appareillage

- Agitateur électrique (Hiedolphvibramax)
- Autoclave (Pbinternational)
- Bain marie (Raypa)
- Balance (Radwag)
- Centrifugeuse (Sigma)
- Etuve (Memmert)
- Pipette pasteur
- Micropipette (Accumax)
- Microscope optique
- pH-mètre (Hannainstruments)
- Réfrigérateur (Campingaz)
- Spectrophotomètre (Biotek)
- Vortex électrique
- Four Pasteur (Pol-Ekoaparatura)
- Plaque chauffante agitatrice (Velpscientifica)+ lecteur microplaque

2. Réactifs, colorants et autres

- L'eau oxygénée
- Eau physiologique
- Ethanol
- Lugol
- Fuchsine
- NaCl
- NaOH (1 N)
- Huile à immersion
- HCl (1 N)
- Crystal Violet
- Violet de Gentiane

Annexe 02 : Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)**Tableau I :** Composition de l'eau physiologique

Composition	Quantité
Chlorure de sodium	9g
Eau distillé (QSP)	1L
pH = 7 autoclavage à 120 °C/20min	

Tableau II : Composition du bouillon MRS (de Man, Rogosaet Sharpe, 1960).

Composition	Quantité
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
pH = 6,5, autoclavage à 120 °C/20min	

Tableau III: Composition du bouillon nutritif

Composition	Quantité
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée (QSP)	1L
pH = 7,2 autoclavage à 120 °C/20min	

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

Tableau V : Composition de la gélose Mueller-Hinton.

Composition	Quantité
Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
pH = 7 autoclavage à 120 °C/20min	

Tableau VI : Composition de la Gélose Chapman

La composition	Quantité
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Peptone	10g
Agar	15g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0,025g
pH=7,4 Autoclaver à 120°C/20min	

Annexe 03 : classification des lactobacilles

Tableau I : Les sous-groupes *Lactobacillus* (Orla et Jensen) Streptobacteries, Bêtabactéries et Thermobacteries. (Carr *et al.*, 2002).

	Températures de croissance		Gaz de glucose	Gaz gluconate	Arginine hydrolysé	Fermenter pentasase substrats	Exigence Thiamine	Acide lactique depuis glucose
	15°C	45°C						
Thermobactéries	(+)		-	-	-	-	-	+
Streptobactéries	(+)	(V)	-	+	(-)	+	-	+
Bêtabactéries	(+)	(V)	+	+	+	+	+	+
	Prédominant acide lactique tapé				Fructose fermenté et réduit à mannitol			
Thermobactéries	(L+),		(D-),	DL,	-			
Streptobactéries	(L+), (D-), DL,				-			
Bêtabactéries	(DL)				+			

+ indique un résultat de test positif ; - indique un résultat de test négatif ; V indique variable, certains produisent des résultats (+) ou (-) ; D(-) indique l'acide dextro-lactique ; L(+) indique l'acide lévo-lactique ; DL indique un mélange d'acide lactique D et L.

Tableau II : Classification de *Lactobacillus plantarum* (Behera *et al.*, 2018)

Domaine	Bactéria
Phylum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillales
Famille	<i>Lactobacillaceae</i>
Genre	<i>Lactobacillus</i>
Espèce	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Annexes 04



Figure 1 : Image micro-morphologique de souche *Lactobacillus plantarum*

(Arasu *et al.*, 2016).

Annexe 05 :

Les trois sortes de toxi-infection alimentaire :

- Les toxi-infections alimentaires à symptomatologie digestive sont les plus fréquentes mais bénignes, mais toutes peuvent causer des états très graves si le traitement n'est pas instauré.
- Les toxi-infections alimentaires à symptomatologie nerveuse ou botulisme, rare mais habituellement graves.
- Les toxi-infections alimentaires vaso-motrices, rares et bénignes l'action de surveiller la nourriture « de la fourchette » pour s'assurer qu'elle ne provoquera pas de maladie transmise par la voie alimentaire est connue comme sous le terme de sécurité alimentaire (kahlal *et al.*, 2020).

Annexe06 :

Tableaux I : Valeurs d'absorbance mesurées après adhésion des isolats lactiques

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,057	0,064	0,045	0,047	0,05	0,081	0,044	0,06	0,044	0,041	0,046	0,05
B	0,089	0,549	0,635	0,844	0,053	0,058	0,051	0,674	0,28	0,536	0,069	0,055
C	0,089	0,719	0,645	0,69	0,066	0,056	0,047	0,7	0,672	0,67	0,048	0,054
D	0,051	0,639	0,321	0,57	0,056	0,061	0,047	0,651	0,219	0,292	0,05	0,056
E	0,04	0,059	0,05	0,052	0,054	0,074	0,084	0,047	0,046	0,057	0,055	0,05

	Témoin
	Souche Lb47
	Suoche Lb9

Résumé

La présente étude a pour but d'évaluer quelques propriétés probiotiques de deux souches de *Lb.plantarum* et de leurs pouvoir antagoniste à l'égard de *S.aureus*.

Les résultats des tests *in vitro* d'activité antibactérienne (tests des puits et spots) ont montré que les deux souches de *Lb.plantarum* (Lb9 et Lb47) testées ont un pouvoir antagoniste important vis-à-vis de *S.aureus*. Un diamètre maximal de 25 mm a été enregistré pour la souche Lb47 pour le test des spots, et de 11mm de diamètre pour Lb9 par le test des puits.

L'évaluation du potentiel probiotique des deux souches de *Lb.plantarum* comprenait la survie de deux souches dans des conditions simulées du tractus gastro-intestinal. Les deux souches testées étaient résistantes à pH 2 et à une concentration de 0,3% de sels biliaires pendant les 3h et après 24h d'incubation. En effet des taux de survis avoisinant 100% ont été obtenus.

Les résultats du test d'adhésion des deux souches sur la microplaque polystyrène ont montré une forte capacité d'adhérer et de former de biofilms.

Ces résultats suggèrent l'utilisation des deux souches étudiées comme probiotiques et ou bioconservateurs dans les aliments.

Mots-clés : *Lactobacillus plantarum*, probiotique, antagonisme, *Staphylococcus aureus*,

Abstract

The present study aimed to evaluate some probiotic properties of two strains of *Lb. plantarum* and their antagonistic power towards *S.aureus*.

The results of the *in vitro* antimicrobial activity tests (well and spot tests) showed that the two *Lb. plantarum* strains (Lb9 and Lb47) tested have a very wide spectrum of antagonistic and inhibitory activity towards *S. aureus*, a maximum diameter of 25mm was recorded for the Lb47 strain in the spot test, and 11mm diameter for Lb9 with well test.

The probiotic potential studies of two *Lb. plantarum* strains included the survival of two strains under simulated gastrointestinal tract conditions; both tested strains were resistant to low pH (pH2) and to a concentration of 0.3% of bile salts during 3h and after 24h of incubation.

The results of the adhesion test of the two strains on the polystyrene microplate show a strong capacity to adhere and form biofilms.

These results suggest the use of the two studied strains as probiotics and or biopreservatives in foods.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, probiotic, antagonism, *Staphylococcus aureus*.

