



A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stockage** dans des conditions différentes selon la version du kit :
 - Stocker la boîte de pétri noté « M » contenant la souche de *Micrococcus* à **+4°C** couvercle vers le bas , (conservation pendant 10 jours, mais repiquage conseillé: voir p 5-6)
 - Stocker la bouteille de milieu riche à couler à **température ambiante** (conservation pendant 1 an)
 - Stocker les gélules de *Lactobacillus* à **température ambiante** (conservation pendant 1 an)
 - Le reste du matériel se stocke à **température ambiante**
- Aucun de produits livrés ne présentent de dangers**

COMPOSITION DU COLIS :

Composition pour 30 élèves :

- Une souche de *Micrococcus*
- 2 gélules de *Lactobacillus plantarum*
- 2 bouteilles de 300 ml de milieu PCA à couler
- 30 boites de pétri diamètre 90 mm
- 60 discs de papier (pour le dépôt des gouttes de *lactobacillus* et de l'eau)
- 1 sachet d'œses stériles
- 2 tube de 10 ml d'eau stérile
- 1 tubes de 50 ml d'eau stérile
- 3 poires de pipetage
- Notice technique et pédagogique

MATERIEL NECESSAIRE :

Pour toutes les versions du kit :

- Récipient d'au moins 2 L
- Matériel de l'option « matériel »
- Feutres permanents
- Bec bunsen électrique ou hotte à flux
- Micro-ondes ou bain-marie
- Gants anti-chaueur

MATERIEL RECOMMANDE :

Vortex , Etuve

FICHE PREPARATEUR

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : à réaliser en conditions de stérilité (bec bunsen ou électrique ou encore hotte à flux)

1) Préparation du milieu pour les levures

Possibilité de se servir d'un bain-marie ou d'un micro-ondes (réaliser cette étape en avance pour plus de sécurité)

- **Avec un bain-marie :**

- Placer la bouteille dans un bain-marie bouillant avec le bouchon légèrement dévissé
- Surveiller l'avancée de la fonte du milieu. La totale dissolution prend environ 30 à 60 minutes (cette étape peut être beaucoup plus longue si la température du bain n'est pas suffisante)

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : manipuler avec précaution, pour éviter toute brûlure, utiliser des gants anti-chaaleur

- Laisser légèrement refroidir (attention, il ne faut couler la gélose quand elle est encore bien liquide)
- Couler les 30 boîtes avec la bouteille : 20 ml par boîte environ.
- Laisser complètement refroidir
- Conserver les boîtes couvercle vers le bas à 4°C

- **Avec un micro-ondes :**

- Placer la bouteille avec bouchon dévissé au micro-ondes à puissance moyenne pour éviter les projections
- Contrôler l'état du milieu toutes les 30 secondes et agiter par rotation
- Arrêter le chauffage lorsqu'il ne reste plus de grumeaux et que le milieu est bien homogène.
- Laisser légèrement refroidir (attention, il ne faut pas couler la gélose quand elle est encore trop chaude)
- Couler les 30 boîtes avec la bouteille : 20 ml par boîte environ.
- Laisser complètement refroidir
- Conserver les boîtes couvercle vers le bas à 4°C

2) Repiquage éventuel de la souche de micrococcus

Utilisation sous 8 jours après réception sinon repiquer la souche sur un boîte gélosée de PCA précédemment coulée.

3) Préparation de la « suspension mère M » de Micrococcus :

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : étape à ne pas préparer en avance mais juste avant le début du TP pour que les cellules n'éclatent pas

- Prélever, avec une œse stérile, quelques colonies de micrococcus isolées sur boîte de pétri
- Mettre en suspension dans le tube contenant les 50 ml d'eau stérile
- Agiter
- Continuer ces étapes de prélèvement et de mise en suspension jusqu'à obtention d'une suspension trouble
- Agiter énergiquement (au vortex si possible) pour rendre la suspension bien homogène
- Noter ce tube « suspension mère »

4) Préparation de la suspension de Lactobacillus « suspension L »

NB : à faire 3H avant le TP ou la veille

En conditions stériles ouvrir les 2 gélules de Lactobacillus et les verser dans le tube de 10 mL d'eau stérile. Bien agiter le tube. Dévisser d'1/4 de tour le bouchon et mettre à l'étuve à 30°C pour 3H minimum (ou la veille du TP).

5) Mise en place

- Placer les deux tubes de solutions mères (lactobacillus et micrococcus) autour d'un bec bunsen allumé, si possible dans un portoir pour éviter les renversements.
- Installer une poire à pipeter dans chaque tube de solution mère, à disposition des élèves

MANIPULATION

⚠ ⚠ ATTENTION ⚠ ⚠ : à réaliser en conditions de stérilité (bec bunsen ou électrique ou encore hotte à flux)

1. Prélèvement de 1,5 ml de solution mère de micrococcus à la poire
2. Verser la solution mère sur la boîte de pétri gélosée
3. Faire bouger la boîte délicatement de manière à ce que le liquide se répande partout sur la boîte.
4. Ré-aspirer le surplus si besoin.
5. Laisser sécher quelques minutes la boîte, ouverte, dans le cône de stérilité du bec bunsen.
6. Poser deux discs en papier sur la gélose
7. Déposer d'une goutte de suspension de Lactobacillus sur un des deux discs.
8. Déposer une goutte d'eau stérile sur le deuxième disc (témoin)
9. Observation possible dès le lendemain des zones de destruction surtout par les bactériocines de type plantaricines.

APRES LE TRAVAIL DES ELEVES

1) Incubation :

Incuber les boîtes sans les parafilmer pendant 1 jours à 30°C, couvercle vers le bas
Puis conserver à 4°C couvercle vers le bas jusqu'à la séance d'observation des résultats.

NB : Si un contaminant (type champignon par exemple) apparaît sur une boîte, écartez-la immédiatement pour éviter de contaminer les autres boîtes de la pile.

2) Nettoyage

Placer tous les instruments dans l'eau de javel (concentration = 1%) en fin de manipulation.

FICHE TRI ET RECUPERATION

La gélose des boîtes doit être décontaminée des éventuels contaminants avec de la javel (concentration 1%) ou de l'eau oxygénée puis jetée à la poubelle.

Les boîtes de pétri ayant contenu la gélose peuvent être jetées dans les bacs de récupération du plastique après avoir bien été décontaminées.

⚠ ⚠ ATTENTION ⚠ ⚠ : on ne contrôle jamais totalement ce qui pousse sur milieu complet, la décontamination est obligatoire.

RESULTATS ATTENDUS



PRINCIPE ET INTERET PEDAGOGIQUE :

I. Action des bactériocines de *Lactobacillus plantarum* participant aux défenses de l'organisme

Ce kit permet d'aborder les thématiques « Microbiote humain et santé » de Seconde, et éventuellement « D'autres mécanismes contribuant à la diversité du vivant : associations non héréditaires avec le cas du microbiote acquis » en Terminale Spécialité.

Il permet de développer un cas concret de défense de l'organisme par des bactéries du microbiote intestinal contre d'autres bactéries potentiellement pathogènes. Ainsi il met en évidence que des bactéries symbiotiques intestinales, *Lactobacillus plantarum*, sécrètent des substances d'attaque appelées bactériocines (plantaricines) détruisant des *Micrococcus*, bactéries présentes notamment dans le sol et sur les aliments.

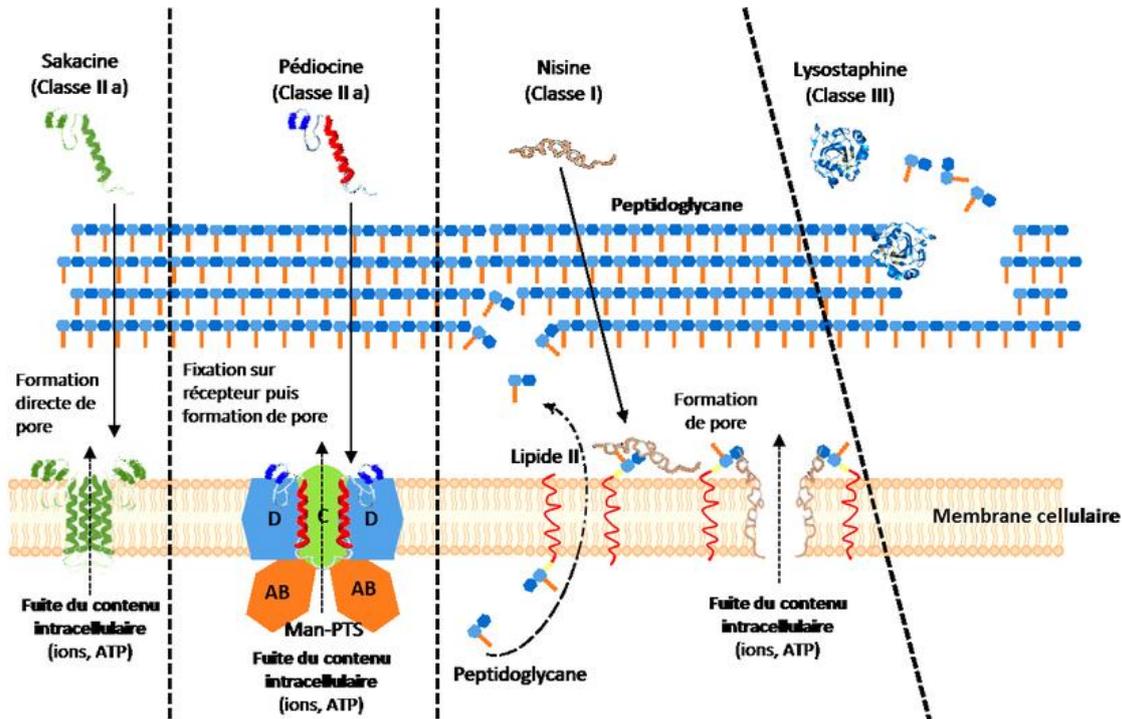
II. Quelques données scientifiques

La première bactériocine a été découverte en 1925 par A. Gratia qui a nommé sa découverte colicine, puisqu'elle tuait uniquement les bactéries de la souche *E. coli*. Cependant, sa découverte fut éclipsée peu de temps après par celle du premier antibiotique, la pénicilline, qui était nettement plus efficace contre tous les types de bactéries. L'effet miracle des antibiotiques n'aura pas duré à cause de leur surutilisation qui a engendré l'émergence de souches de bactéries résistantes comme les redoutables MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*) et VRE (Vancomicine Resistant *Enterobaccilus*).

L'aspect qui retient le plus l'attention au sujet des bactériocines est qu'elles possèdent un mécanisme d'action différent par rapport aux antibiotiques. Par exemple, ces derniers peuvent inhiber la synthèse de la membrane cellulaire et des éléments essentiels pour la survie des bactéries tandis que les bactériocines, elles, peuvent former des trous dans la membrane bactérienne. Ainsi, théoriquement, les bactéries résistantes aux antibiotiques ne devraient pas être résistantes aux bactériocines, puisqu'elles ne font pas appel au même mécanisme. En effet, en 2008, une étude *in vivo* portée chez les souris a montré que la mersacidine (bactériocine produite par l'espèce *Bacillus*) était capable d'inhiber la croissance d'une des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques la plus problématique : MRSA.

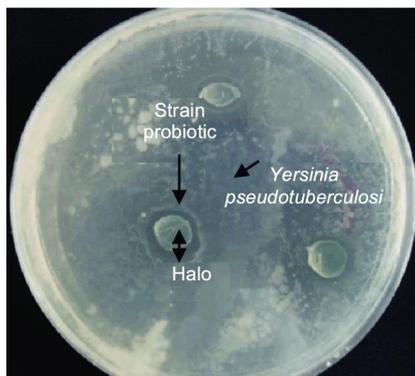
<https://www.ficsum.com/dire-archives/volume-22-numero-3-automne-2013/les-bacteriocines-contre-la-resistance-bacterienne-mathieu-lussier-price-departement-de-biochimie-et-medecine-moleculaire/>

III. Mode d'action des peptides antimicrobiens d'origine microbienne



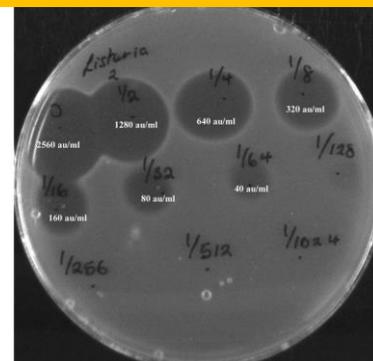
Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif. Schéma proposé par Fernandez (2014) et repris ici sans modifications. La sakacine, une bactériocine de classe IIa, agit directement au niveau de la membrane interne en formant un pore conduisant à la mort de la bactérie cible. La pédiocine PA-1, appartenant aussi à la classe IIa, se fixe sur l'unité D du mannose phosphotransférase (enzyme transmembranaire multimérique). Elle s'internalise et force le canal à rester ouvert, conduisant à la fuite du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie cible. La nisine, une bactériocine de classe I, se fixe sur le lipide II transmembranaire impliqué dans la synthèse du peptidoglycane. Elle s'internalise et forme des pores tout en bloquant la fonction du lipide II. Enfin, la lysostaphine, une bactériocine de classe III agit directement au niveau du peptidoglycane (Figure 7) (Fernandez, 2014).

Inhibitory action of *Lactobacillus plantarum* against *Yersinia pseudotuberculosis*



https://www.researchgate.net/publication/317501109_EVALUATION_in_vitro_OF_THE_ACTION_OF_Lactobacillus_plantarum_WITH_PROBIOTIC_CHARACTERISTICS_ON_Yersinia_pseudotuberculosis

Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese



<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-10-S1-S7>