

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie en Secteur Biomédical et Vétérinaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'effet synergique de
l'imipenème associé à une bactériocine
vis-à-vis des bactéries multi-résistantes**

Présenté par :

BOUDJADA Aida et LALAOUI Dihia

Soutenu le : **16 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M. TOUATI A.	Professeur	Président
M. BENDJEDDOU K.	MCB	Encadreur
Mme .GHAROUT A.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier dieu le tout puissant, de nous avoir donné la volonté et le courage pour élaborer ce travail.

Nos remerciements les plus distinguées vont pour notre promoteur, le Docteur BENDJEDDOU K. pour son encadrement et pour ce qu'il a transmis à nous comme savoir.

Nous saisissons cette occasion pour lui exprimer notre profonde gratitude tout en lui témoignant notre respect.

Merci pour le professeur TOUATI A. d'avoir accepté de présider le jury qui a évalué ce travail, d'autres parts, nous tenons également à remercier M^{me} GHAROUT A. d'avoir accepté d'être membre de jury.

On les remercie aussi d'avoir été parmi ceux qui nous ont formé durant notre cursus.

Nos remerciements particuliers et sincères vont pour M^r BAKOUR, Mr KRIM, M^r BELMAHDI, M^{me} BELHADI, M^{me} MOUICI et l'ingénieur de laboratoire M^{me} RAHMANI pour son soutien moral et matériel.

Enfin, nous adressons nos remerciements à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma mère : Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Mon père: Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Mes chères sœurs FARIDA, ILHAM et mon seul cher frère RIAD

A mon très cher fiancé et mes beaux parents, mes beaux frères et ma belle sœur pour leurs encouragements

A tous les membres de ma famille, petits et grands
Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

A ma très chère copine, mon binôme Dihia

A mes chères amies

Aida

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma mère : Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Mon père : Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Ma chère et ma seule sœur Celia et mes frères Badis et Samy

A tous les membres de ma famille, petits et grands
Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

Un merci tout spécial à ma tante Fadila pour son soutien moral et matériel et ma très chère tante, copine, sœur kahina

A ma chère copine, mon binôme Aida avec laquelle j'ai partagé de très bons moments au laboratoire

A tous mes chères ami (e)s.

Dihia

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Introduction.....01

Matériel et méthodes

I. Origine des souches utilisées06

II. Détermination des CMI des souches multirésistantes vis-à-vis de l'imipenème en milieu solide (CA-SFM, 2010)07

 II- 1 : Préparation des boîtes.....07

 II- 2 : Préparation de l'inoculum.....07

 II- 3 : Ensemencement des boîtes.....08

 II- 4 : Lecture08

III. Revivification de *Lactobacillus. paracasei* subsp *.paracasei* 08

IV. Vérification de l'activité antibactérienne de *Lb. paracasei* à l'égard d'*E. coli*.....08

V. Essai de purification partielle de la bactériocine produite par *Lb.paracasei*.....09

V.I- Chromatographie en phase inverse.....09

 V.I-1 Préparation de la colonne09

 V .I-2 Chromatographie liquide sur colonne C18.....10

VI. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *Lb .paracasei* vis-à-vis des souches résistantes à l'imipenème.....11

VII. Test de synergie imipenème-bactériocine.....	11
VII-1 : Test de synergie sur milieu solide.....	12
VII-2 :Synergie sur milieu liquide « Technique des microplaques »	12

Résultats et Discussion

I .Détermination des CMI des souches multi-résistantes.....	13
II .Mise en évidence de l'effet antibactérien de <i>Lb. paracasei</i> à l'égard d' <i>E. coli</i>	14
III. Extraction et purification partielle de la bactériocine produite par <i>Lb. paracasei</i>	14
IV .Test de synergie entre la bactériocine et l'imipenème.....	15
IV-1 : Test de synergie sur milieu solide	15
VI-2 : Test de synergie sur milieu liquide « Technique des microplaques ».....	17
Discussion.....	21
Conclusion.....	24

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau N°I : Les souches bactériennes et leurs mécanismes de résistance	06
Tableau N°II : Préparation de la gamme d'antibiotiques (CA-SFM, 1995).....	07
Tableau N°III : Préparation d'un gradient croissant d'acétonitrile dans la solution TFA à 0,05%.....	10
Tableau N° IV : Les résultats de synergie sur les microplaques.....	20

Liste des figures

Figure 1 : Montage de la chromatographie effectuée sur gel de C18 de type Discovery DSC-18.....	11
Figure N°2 : Résultats des CMI pour les souches multi-résistantes	13
Figure N°3 : Mise en évidence de l'effet antibactérien de <i>Lb. paracasei</i> à l'égard d' <i>E.coli</i>	14
Figure 4 : Test d'activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard d' <i>E.coli</i>	15
Figure 5 : Test de synergie entre la bactériocine et l'imipénème chez les souches résistantes à l'imipénème.....	16
Figure 6 : Test de synergie de l'imipénème et la bactériocine produite par <i>Lb. paracasei</i> chez les souches : (1) : <i>Klebsiella pneumoniae</i> nasey, (2) : <i>Klebsiella pneumoniae</i> VIM , (3) : <i>Acinetobacter baumannii</i> OXA-58	18
Figure 7 : Test de synergie de l'imipénème et la bactériocine produite par <i>Lb. paracasei</i> chez les souches : (4) : <i>Klebsiella pneumoniae</i> 144, (5) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 76119.....	19
Figure 8 : Test de synergie de l'imipénème et la bactériocine produite par <i>Lb. paracasei</i> chez les souches : (6) : <i>Acinetobacter baumannii</i> OXA-24, (7) : <i>E.coli</i> OXA-48, (8) : <i>E.coli</i> ATCC 25992.....	19

Liste des abréviations

°C : Degré celsius

ACN : Acétonitrile

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

BGN : Bacilles à Gram Négatif

BMR : Bactérie Multi Résistantes

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

EPEC: Escherichia coli entéropathogène

FICI: Facteur d'Indexe Concentration Inhibitrice

IMP: Imipenème

KPC: *klebsiella Pneumoniae Carbapénèmase*

Lb: Lactobacillus

MβL : Métallo-β-Lactamase

MH: Mueller Hinton

MRS: Man Rogosa et Sharpe

ND: Non Déterminée

OXA : Oxacillinase

PLP : Protéine Liant Pénicilline

R : Résistant

S : Sensible

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Subsp : Sous espèce

TFA : acide Trifluoroacétique

UFC /ml : Unité Format Colonies par Millilitre

VIM : Verona integron-encoded metallo-β-lactamase

La résistance bactérienne aux antibiotiques est une réalité connue presque depuis l'aube de l'ère des antibiotiques, mais ce n'est que dans les vingt dernières années que l'émergence des souches résistantes a eu lieu avec une régularité inquiétante. Les bactéries à Gram négatif sont de plus en plus incriminées, notamment les entérobactéries, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* (Juste et Tor., 2014). L'émergence de ces bactéries multi-résistantes est souvent liée à une utilisation inadéquate et parfois abusive des antibiotiques (Frasca et *al.*, 2008).

Parmi les antibiotiques les plus efficaces contre les infections dues aux bacilles à Gram négatif, on trouve les carbapénèmes qui jouent un rôle extrêmement important dans notre arsenal antibiotique. Parmi des centaines de β -lactames, les carbapénèmes sont des antibiotiques d'importance majeure pour le traitement probabiliste des infections nosocomiales et communautaires sévères en raison de leur très large spectre d'activité et de leur grande stabilité à l'égard de nombreuses enzymes hydrolytiques (Nordmann et *al.*, 2014). Par conséquent, ils sont souvent utilisés comme «agents de dernière ligne» ou «antibiotiques de dernier recours» lorsque les patients présentant des infections deviennent gravement malade ou sont soupçonnés d'abriter des bactéries résistantes (Torres et *al.*, 2007).

L'imipénème, mis sur le marché pour la première fois en 1985, est le premier représentant les carbapénèmes, puis d'autres produits ont été développés : méropénème, ertapénème et plus récemment le doripénème. L'imipénème a montré une efficacité clinique et bactériologique pour traiter les infections compliquées. Contrairement aux trois autres molécules, il est dégradé par la déhydropeptidase-1 (DHP-1) rénale et doit donc être administré avec la cilastatine, un inhibiteur de cette enzyme (Grall et *al.*, 2013).

Malheureusement, l'émergence de bactéries pathogènes multi-résistantes menace sérieusement cette classe de médicaments d'importance vitale (Queenan et Bush., 2007).

Des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont rapportées avec une fréquence croissante dans le monde, depuis leur première description il ya plus de 20 ans (Nordmann et *al.*, 2014).

La résistance aux carbapénèmes comprend plusieurs mécanismes dont la production de β -lactamases, les pompes à efflux et des mutations qui altèrent l'expression et / ou la fonction de porines et de protéines liant pénicillines (PLP). Des combinaisons de ces mécanismes peuvent causer des niveaux élevés de résistance aux carbapénèmes chez certaines espèces bactériennes, telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Nordmann et al., 2009).

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste majeur responsable de légère à de graves infections nosocomiales. La résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa* est principalement due à la réduction de la perméabilité par perte de la porine OprD, cette perte entraîne une augmentation de la CMI, rendant la souche résistante aux carbapénèmes, lorsqu'elle s'accompagne de l'hyper-expression du mécanisme d'efflux, les CMIs peuvent être aussi plus élevées (Livermore, 2001).

Acinetobacter baumannii a évolué d'un habitant commensal des établissements de santé pour constituer l'un des agents pathogènes les plus épuisants responsables des épidémies dans les hôpitaux (Ignasi et al., 2012).

Les carbapénémases, constituent une famille très composite, définie sur la base d'un spectre enzymatique hydrolysant au moins un carbapénème (Grall et al., 2013). Elles sont classées en 3 familles :

- Carbapénémases de classe A : ce sont des pénicillinases, les plus courantes sont les carbapénémases de *Klebsiella pneumoniae* (KPC). La première souche productrice de KPC a été isolée en 1996 en Caroline du Sud. Les enzymes de type KPC sont capables d'hydrolyser presque toutes les β -lactamines, à l'exception des céphamycines et de la ceftazidime qui sont peu modifiées. Ces enzymes sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactame (Cuzon et al., 2010).
- Les carbapénémases de la classe B : ce sont des métallob- β -lactamases (MBL). Deux principaux groupes de métallob-carbapénémases ont été décrits : les enzymes de type IMP et VIM. Ces Enzymes hydrolysent fortement les β -lactamines exceptés

les monobactames (l'aztréonam). Leur activité est inhibée par l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif de l'enzyme (Boutet et *al.*, 2012).

- Les carbapénèmases de la classe D : ce sont des oxacillinases, ces enzymes hydrolysent fortement les carbapénèmes et se caractérisent par une hydrolyse plus efficace de l'oxacilline mais pas ou peu les céphalosporines de troisième génération. La première carbapénémase de type oxacillinase, OXA-23, a été décrite en 1993 dans une souche d'*A. baumannii* multi-résistant isolée en 1985 en Ecosse (Paton et *al.*, 1993). Les oxacillinases sont habituellement inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium (NaCl) ce qui permet d'identifier leur production (Zarrilli et *al.*, 2009).

Ce qui complique davantage le problème de la résistance aux antibiotiques est le fait que la recherche de nouveaux agents antibiotiques est actuellement au point mort. De plus le développement commercial de nouvelles substances antibiotiques a diminué au cours des 15 dernières années. Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies innovatrices pour les combattre.

Les bactériocines sont des protéines, ou complexes protéiques, ayant une activité bactéricide ou bactériostatique contre des espèces proches de la souche productrice (Tagg et *al.*, 1976). Cette définition reste la plus largement acceptée jusqu'à nos jours.

Cependant, le nombre de bactériocines ne répondant pas à cette définition surtout en ce qui concerne leur spectre d'activité ne cesse d'augmenter. De ce fait, Cotter et *al.*, (2006), ont proposé une autre définition qui reste la plus adaptée à toutes les bactériocines connues. Ils ont défini les bactériocines comme étant « des substances d'origine bactérienne, de nature protéique, synthétisées par des ribosomes et sécrétées dans le milieu extracellulaire pour inhiber la croissance de bactéries typiquement proches de la bactérie productrice et qui exprime, quant à elle, une immunité spécifique contre sa propre bactériocine ».

Les bactériocines sont généralement petites, cationiques, et thermostables. Leur poids moléculaire est relativement petit (2-6 kDa) ce qui leur permet d'accéder aux cellules

cibles et perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface spécifiques ou non spécifiques (Todorov et al., 2011).

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mécanisme d'action semble être différent (Dortu et Thonart., 2009).

Les travaux menés par Barrena-Gonzalez et al., (1996) et Martinez-Cuesta et al., (1997) ont montré que les bactériocines, une fois adsorbées sur les bactéries sensibles, peuvent avoir trois effets différents :

- ✓ un effet bactériostatique aboutissant à un ralentissement ou un arrêt de croissance bactérienne sans mortalité cellulaire. Une reprise de croissance pourrait être observée après le contact entre les bactéries sensibles et la bactériocine.
- ✓ un effet bactéricide où une mort cellulaire est observée mais les bactéries gardent leur intégrité physique, car il n'y a pas de lyse bactérien.
- ✓ un effet bactériolytique où la mort des bactéries est principalement due à une lyse cellulaire.

Vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (Albano et al., 2009).

Il existe des études qui ont démontré la capacité des producteurs de bactériocine d'inhiber les agents pathogènes dans le tractus gastro-intestinal. Plus particulièrement, il a été constaté que *Listeria salivarius* UCC118 offre une protection contre *Listeria monocytogenes* qui infecte les souris, ainsi la nisine et la lacticine 3147 sont utilisées dans les produits de nettoyage et de protection des mamelles pour lutter contre les mammites chez les vaches (Cotter et al., 2005).

Des rapports sur l'utilisation thérapeutique des bactériocines comme la mersacidine, produite par *Bacillus* sp, souche HIL Y85, était également actif contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez les souris. Cette bactériocine a pu éliminer complètement SARM de l'épithélium nasal des souris (Kruszewska et al., 2004). En plus des bactériocines, d'autres substances antibactériennes

d'origine non microbiennes (végétales, insectes) sont étudiées pour leurs effets antibactériens. Diverses études *in vitro*, ont montré des effets synergiques entre les antibiotiques et les composés purs d'origine végétale comme baicaline, tellimagrandin I, l'épigallocatechine gallate ou berbérine (Hemaiswarya *et al.*, 2008) ou des extraits naturels comme l'extrait d'ail (Jabar et Al-Mossawi., 2010).

Cependant, rares sont les travaux réalisés sur l'association des antibiotiques aux bactériocines. D'après Naghmouchi *et al.*, (2013), l'association des bactériocines aux antibiotiques augmente l'effet de ces derniers. Ces auteurs ont démontré que l'association de la pédiocine PA-1 à la polymyxine E, a un effet inhibiteur important sur *L. monocytogenes* et *E. coli* résistants à la polymyxine E. Ces mêmes auteurs ont rapporté que l'association de la pédiocine PA-1 à la colistine, a permis de diminuer la CMI de cet antibiotique de 0,12 µg/ml à 0,03 µg/ml chez *E. coli*.

C'est dans cet ordre d'idée que s'inscrit ce travail, dont le but est d'essayer d'étudier l'effet de l'association de l'imipénème à une bactériocine produite par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, sur la résistance aux carbapénèmes de certains bacilles à Gram négatif.

I. Origine des souches utilisées :

La souche de *Lactobacillus paracasei*, a été utilisée pour la production de la bactériocine connue sous le nom Paracaseicin A. Cette souche est identifiée par séquençage d'ADNr 16S et spectrométrie de masse MALDI Toff, est conservée à -18°C dans un bouillon MRS à 20% de glycérol.

De plus, 8 souches cibles résistantes aux antibiotiques sont utilisées. Il s'agit de souches de référence fournis par Monsieur Bakour S. Elles appartiennent aux espèces suivantes : *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*. Elles étaient utilisées comme souches tests pour étudier la synergie entre l'imipénème et la bactériocine. Les souches indicatrices et leur mécanisme de résistance sont présentés dans le tableau N°I.

Tableau I : Les souches bactériennes utilisées dans cette étude et leurs mécanismes de résistance (selon Mr Bakour S.).

Les souches	Mécanisme de résistance	Classe
<i>Acinetobacter baumannii</i> OXA -24	Production d'une carbapénèmase de type OXA-24	Carbapénèmase de classe D
<i>Escherichia coli</i> OXA -48	Production d'une carbapénèmase de type OXA-48	Carbapénèmase de classe D
<i>Acinetobacter baumannii</i> OXA- 58	Production d'une carbapénèmase de type OXA-58	Carbapénèmase de classe D
<i>Klebsiella pneumoniae</i> VIM	Production d'une carbapénèmase de type VIM	Carbapénèmase de classe B
<i>Escherichia coli</i> ATCL	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 76119	ND	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 144	Production d'une carbapénèmase de type KPC-3	Carbapénèmase de classe A
<i>Klebsiella pneumoniae</i> nasey	Production d'une carbapénèmase de type KPC	Carbapénèmase de classe A

II. Détermination des CMI des souches multi-résistantes vis-à-vis de l'imipénème en milieu solide (CA-SFM, 1995) :

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'imipénème sont déterminées en utilisant la méthode de dilution en milieu solide qui permet d'évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques (CA-SFM, 1995). Ainsi, la poudre de l'imipénème (Cilanem 500 mg, RANBAXY, Inde) est dissoute dans l'eau physiologique stérile, à partir de cette solution des dilutions sont effectuées (Tableau II).

Tableau II : Préparation de la gamme d'antibiotiques (CA-SFM, 1995).

Solution initiale ($\mu\text{g/ml}$)	Volume prélevé (ml)	Volume de diluant (ml)	Concentration obtenue ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration finale dans la gélose ($\mu\text{g/ml}$)
5120	1	7	640	64
5120	1	15	320	32
32	4	4	160	16
32	2	6	80	8
8	4	4	40	4

II-1 Préparation des boîtes

2 ml de chaque dilution de l'imipénème sont déposés dans chaque boîte, puis ajouté 18 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion. Après homogénéisation, les boîtes sont laissées solidifier puis séchées 30 minutes à l'étuve.

II-2 Préparation de l'inoculum

Des suspensions bactériennes sont préparées en dissociant 3 à 5 colonies dans 3 ml d'eau physiologique stérile et une dilution de 1/10 est réalisée pour chacune des souches à

tester. La souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 a été utilisée comme témoin négatif.

II-3 Ensemencement des boîtes

5 µl de la suspension bactérienne sont déposés sur le milieu en 2 spots pour chaque souche. Ensuite les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

II-4 Lecture

La lecture se fait après 24 heures d'incubation. La CMI est la plus faible concentration pour laquelle il n'y a pas de croissance visible (colonies).

III. Revivification de *Lactobacillus. paracasei* subsp *.paracasei* :

La revivification de la souche *Lb.paracasei* est effectuée par au moins 3 repiquages successifs sur milieu MRS, jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance bactérienne. L'incubation a été réalisée dans une étuve à 37°C pendant 24h.

IV. Vérification de l'activité antibactérienne de *Lb. paracasei* à l'égard d'*E.coli* :

D'après Bendjeddou et *al.*, (2012), la souche de *Lactobacillus paracasei* utilisée dans cette étude est douée d'une activité anti *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC). Cette activité est attribuée à une bactériocine appelée paracaseicine A.

L'activité de la bactériocine a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose par la technique des puits. Ainsi, un tube de 9ml de bouillon MRS est ensemencé par 1ml d'une culture fraîche (24h /37°C) de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, puis incubé à 37°C pendant 18 h. Après incubation, les cellules ont été éliminées par centrifugation à 12000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant récupéré a subi une concentration sous vide en utilisant un évaporateur rotatif à 40°C. Une boîte de Pétri contenant la gélose Muller Hinton a été ensemencée avec une culture de 18h d'*E.coli* à 10⁶UFC/ml et laissé sécher 15 min à température ambiante, ensuite un puits de 6 mm de diamètre est creusé dans la gélose à l'aide d'un emboué stérile et remplis avec 150 µl du surnageant concentré, la boîte a été laissée pendant 2 h à 4 ° C pour permettre la diffusion totale du surnageant et d'arrêter la croissance du germe cible. Après incubation pendant 24 h à 37°C, la boîte a été

vérifiée pour la présence de zone d'inhibition autour du puits pour démontrer l'activité antibactérienne de la souche de lactobacilles à l'égard d'*E.coli*.

V. Essai de purification partielle de la paracaseicine A produite par *Lb.paracasei* subsp. *paracasei* :

Une culture fraîche de 24h /37°C de *Lactobacillus paracasei* a été utilisée (1ml) pour inoculer 9 ml de bouillon MRS et incubée à 37°C pendant 18h. Cette culture est utilisée pour inoculer 1L (5×200ml) de bouillon MRS à 2%, puis incubés à 37°C/24h. Ensuite les cellules bactériennes ont été séparées par centrifugation (12000 g, 20 min à 4 ° C). Le surnageant dépourvu de cellules a été soumis à une concentration sous vide en utilisant un évaporateur rotatif à 40°C.

D'après Bendjeddou et *al.*, (2012), l'extraction et la purification partielle de la paracaseicine A produite par la souche *Lb.paracasei* subsp. *paracasei* est basée sur l'emploi de Chromatographie en phase inverse C₁₈ (Sep-Pack).

V.I- Chromatographie en phase inverse :

La purification partielle de la substance antibactérienne produite par la souche de *Lb. paracasei* est une méthode de purification basée sur l'emploi de la chromatographie en phase inverse.

La semi-purification est effectuée sur une colonne de gel de silice C₁₈ griffée à 18% de type Discovery DSC-18 (supelco 10g-60ml, USA) en utilisant 2 solvants organiques : acide trifluoroacétique (TFA) et l'acétonitrile selon la méthode décrite par Bendjeddou et *al.*, (2012).

V.I -1 Préparation de la colonne :

Une solution de TFA à 0,05% est préparée en ajoutant 1 ml de TFA concentré à 2l d'eau distillée. La colonne est nettoyée avec 120 ml d'acétonitrile puis équilibrée avec 120ml de la solution TFA.

Des solutions de 120 ml contenant un gradient croissant et discontinu d'acétonitrile dans la solution de TFA à 0,05% sont préparées à des concentrations allant de 10 à 40 % d'acétonitrile (Tableau III).

Tableau III: Préparation d'un gradient croissant d'acétonitrile dans la solution TFA à 0,05%.

Volume d'acétonitrile	Volume de TFA à 0,05 % (ml)	Volume final (ml)	Concentration de la solution en acétonitrile (%)
12	108	120	10%
24	96	120	20%
36	84	120	30%
48	72	120	40%

V .I-2 Chromatographie liquide sur colonne C18 :

Avant le dépôt de l'échantillon sur la colonne de chromatographie, il doit être mis dans les mêmes conditions d'équilibrage de la colonne. Pour ce faire, l'échantillon présentant l'activité antibactérienne est mélangé avec un volume équivalent de la solution de TFA dans l'eau à 0,05%.

L'échantillon équilibré est passé à travers la colonne à un débit de 2 ml /min. Ensuite, la colonne est lavée avec 200 ml de solution TFA dans l'eau à 0,05% en utilisant le même débit.

L'élution est effectuée par 120 ml des solutions contenant le gradient discontinu d'acétonitrile. Enfin, la colonne est lavée avec 120 ml d'acétonitrile (figure 1).

Les fractions obtenues sont évaporées sous vide pour éliminer les solvants organiques et reprises dans 5 ml d'eau distillée.

L'activité antibactérienne de ces fractions est testée vis-à-vis d'*E.coli* par la méthode des puits.



Figure 1 : Montage de la chromatographie effectuée sur gel C18 de type Discovery DSC-18.

VI. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *Lb.paracasei* vis-à-vis des souches résistantes à l'imipénème :

La mise en évidence de l'activité antibactérienne de la fraction active, à l'égard des souches résistantes à l'imipénème est déterminée par la méthode des disques qui consiste à déposer des disques en papier vierge stérile sur des géloses MHensemencées dans les mêmes conditions précédentes. Ensuite 25µl de la fraction suscitée sont mis sur les disques en papier, les boîtes sont pré-incubées pendant 2h à 4°C, puis incubées à 37°C/24h.

VII. Test de synergie imipénème-bactériocine :

La bactériocine produite par *Lb.paracasei* se trouve dans la fraction obtenue avec 30% d'acétonitrile, (Bendjeddou et al., 2012). De ce fait, le test de synergie entre la bactériocine produite par la souche de lactobacilles et l'imipénème, à l'égard des souches résistantes aux antibiotiques est réalisé avec cette fraction. Ce test est réalisé par 2 techniques :

VII.1- Test de synergie sur milieu solide :

Chaque souche est ensemencée sur une gélose Mueller Hinton, ensuite un disque d'imipénème (CYPRESS diagnostics) contenant 10 μ g d'antibiotique et un disque en papier vierge stérile sont déposés sur la gélose à une distance de 1cm l'un de l'autre centre à centre. Sur le disque en papier, 25 μ l de la fraction 30% sont déposés et laissés sécher 10min à température ambiante. La boîte est ensuite incubée à 37°C pendant 24h. La synergie est révélée par l'apparition d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui de la fraction 30%.

VII.2- Synergie sur milieu liquide « Technique des microplaques » :

Pour réaliser ce test, des microplaques stériles de 96 puits sont utilisés. Ces microplaques sont composées de 12 lignes contenant 8 puits chacune. Pour chaque souche étudiée, 4 lignes de 8 puits sont utilisées. Dans le premier puits de chaque ligne, 100 μ l des solutions à tester sont déposés comme suit :

- Première ligne : MH stérile (Témoin).
- Deuxième ligne : Imipénème (1er puits : 32 μ g/ml).
- Troisième ligne : fraction 30 %.
- Quatrième ligne : Imipénème + fractions 30% (1er puits : 32 μ g/ml Imipénème).

A partir du premier puits de chaque ligne, des dilutions en cascade à $\frac{1}{2}$ sont effectuées (en utilisant le bouillon Mueller Hinton) jusqu'au dernier puits. Ensuite, 100 μ l de suspension bactérienne à 10⁵ UFC /ml sont ajoutés à tout les puits de toutes les lignes. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24h. La résistance de la souche à l'antibiotique ou à la bactériocine est révélée par un dépôt (croissance) de cellules bactériennes au fond du puits.

Une synergie entre l'antibiotique et la bactériocine est détectée par la présence d'un dépôt bactérien dans les puits de la bactériocine et de l'antibiotique, et l'absence de croissance dans les puits contenant le mélange des deux antibactériens à la même concentration ou à des concentrations plus faibles que les deux antibactériens séparés.

I : Détermination des CMI des souches multi-résistantes:

D'après les résultats obtenus, il a été noté que les valeurs des CMI de toutes les souches testées sont supérieures ou égales à 64 μ g/ml, à l'exception d'*E. coli* ATCL (Annexe 2). Les résultats sont montrés dans la figure 2.

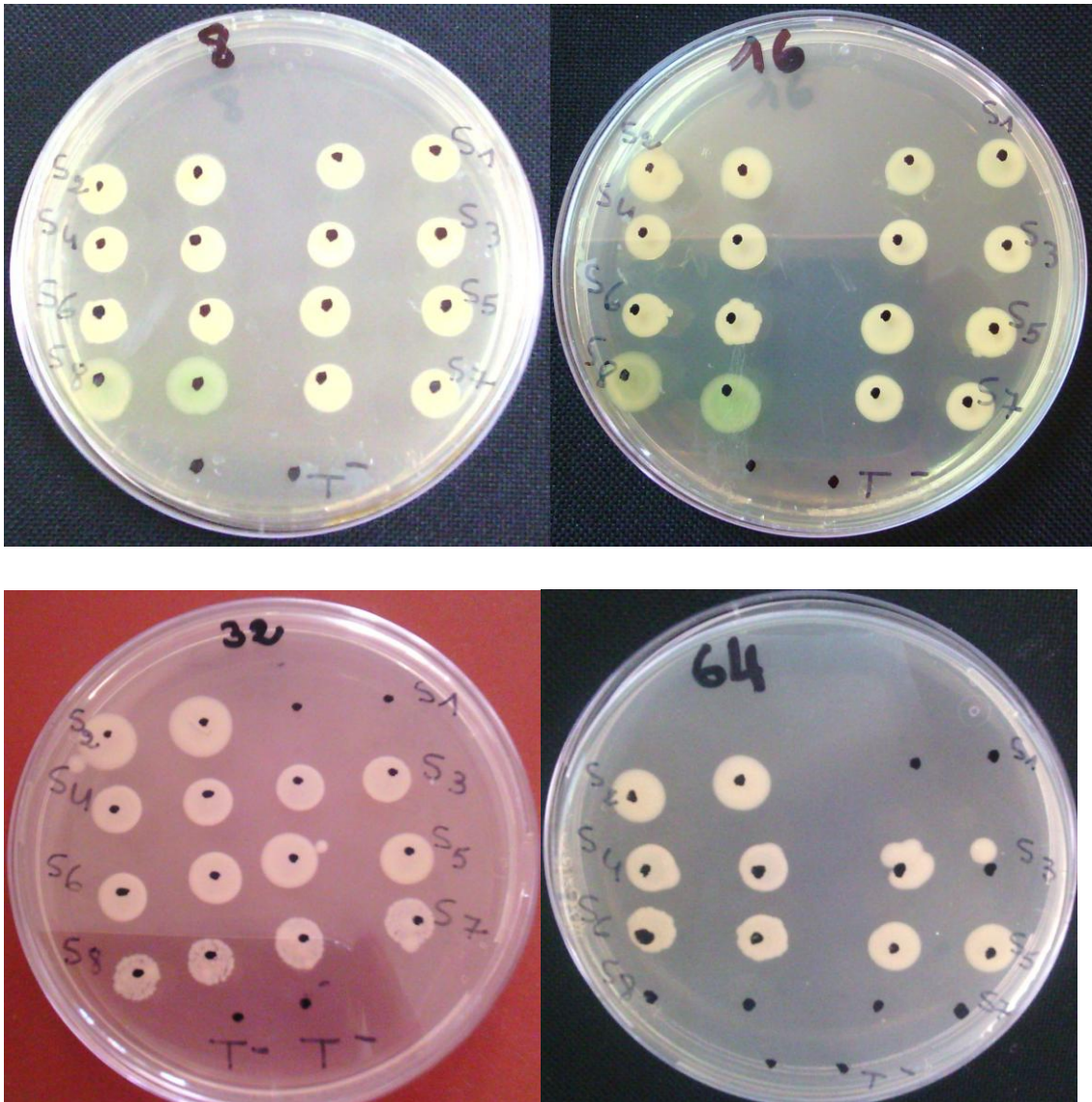


Figure 2: Résultats des CMI pour les souches multirésistantes : (S1) : *E. coli* ATCL, (S2) : *Acinetobacter baumannii* OXA-58, (S3) : *Klebsiella pneumoniae* VIM, (S4) : *Klebsiella pneumoniae* nasey, (S5) : *Acinetobacter baumannii* OXA-24, (S6) : *Klebsiella pneumoniae* 144 , (S7) : *E. coli* OXA-48, (S8) : *Pseudomonas aeruginosa* 76119.

II : Mise en évidence de l'effet antibactérien de *Lb. paracasei* à l'égard d'*E. coli* :

Le test d'activité du surnageant concentré a donné une zone d'inhibition d'un diamètre de 32 mm (Figure 3).

Ce résultat montre que la souche *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est douée d'une activité anti *Escherichia coli* 164.



Figure 3 : Mise en évidence de l'effet antibactérien de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard d'*E. coli*.

III : Extraction et purification partielle de la bactériocine produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* :

Après purification partielle de la bactériocine par chromatographie en phase inverse, une évaporation sous vide des solvants organiques de la fraction 30% a été réalisée.

Le test d'activité antibactérienne de cette fraction à l'égard d'*E.coli* OXA-48 a montré une bonne activité antibactérienne.

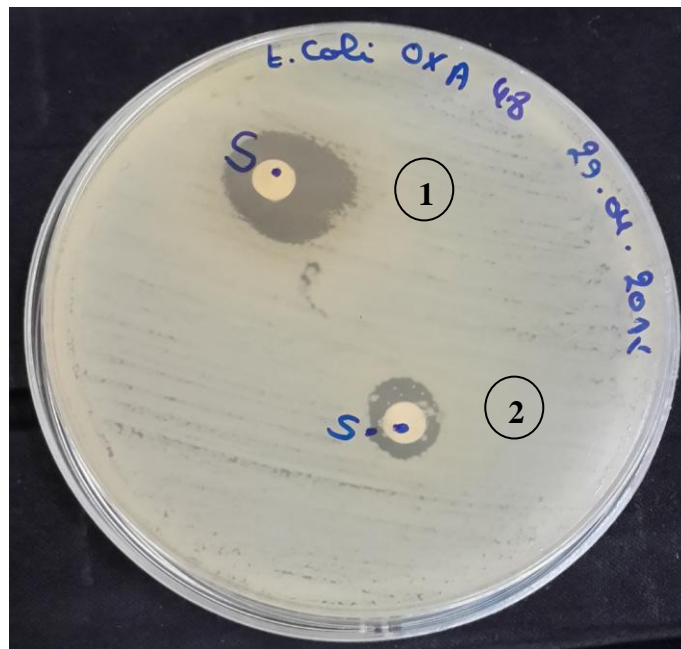


Figure 4 : Test d'activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard d'*E. coli* OXA-48 en utilisant la méthode des disques. (1) : 50 μ l de la fraction 30%, (2) : 25 μ l de la fraction 30%.

IV : Test de synergie entre la bactériocine et l'imipénème :

IV-1 : Test de synergie sur milieu solide :

Le test de synergie entre la bactériocine produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* et l'imipénème a permis de révéler des images de synergie chez les 8 souches.

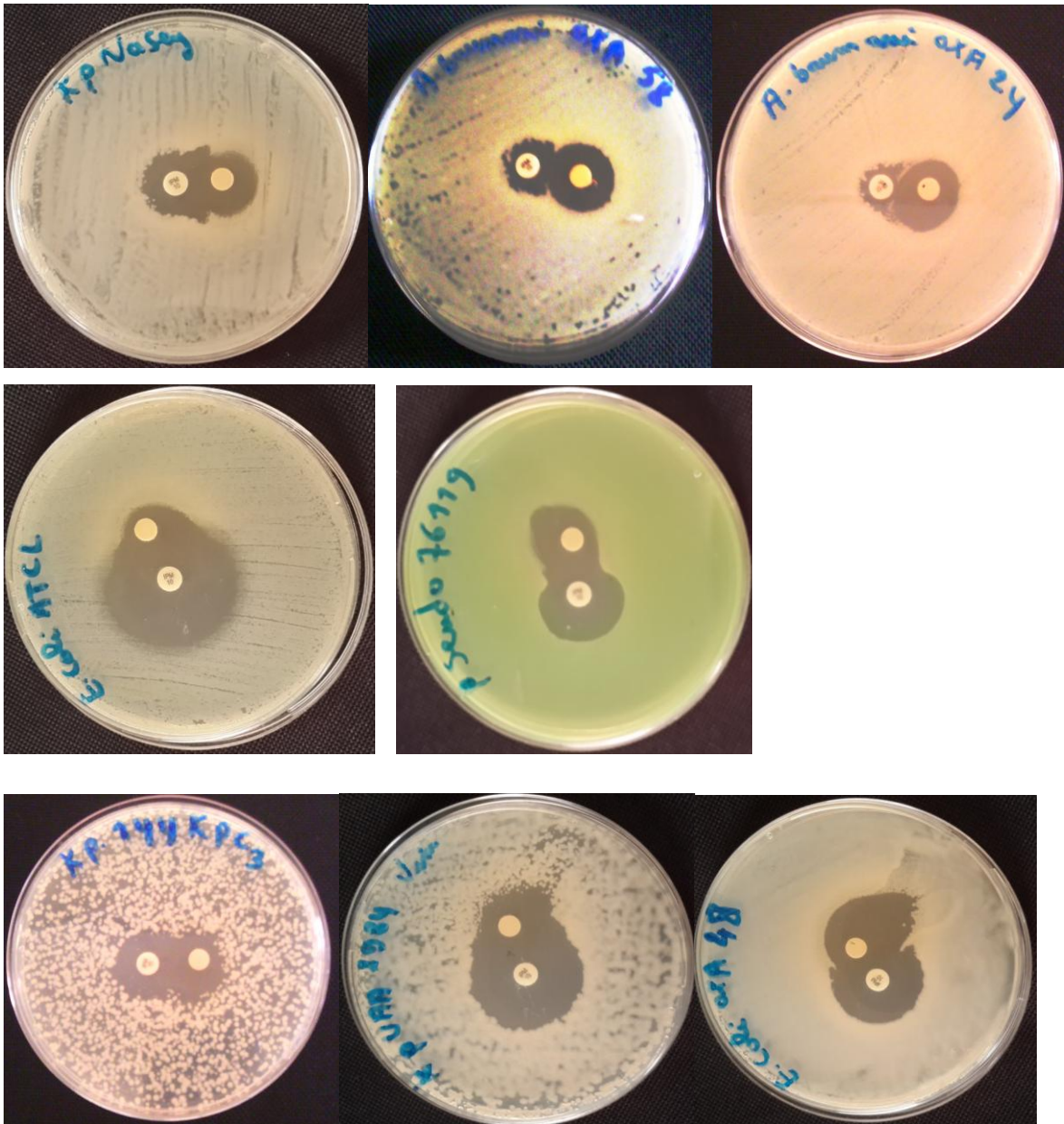


Figure 5: Test de synergie entre la bactériocine et l'imipenème chez les souches résistantes à l'imipenème.

VI-2 : Test de synergie sur milieu liquide « Technique des microplaques » :

Par définition, le nombre d'unités arbitraires (UA) est égale à l'inverse de la plus forte dilution qui donne une zone d'inhibition (ou absence de croissance dans la microplaque).

Selon Naghmouchi et *al.*, (2013) , la synergie entre la bactériocine et l'antibiotique peut être évaluée en calculant un facteur appelé « Facteur de l'Index de la Concentration Inhibitrice » ou « FICI » . Ce facteur est calculé par la formule suivante :

$$\text{FICI} = \frac{\text{CMI de l'antibiotique dans le mélange}}{\text{CMI de l'antibiotique seul}} + \frac{\text{CMI de la bactériocine dans le mélange}}{\text{CMI de la bactériocine seule}}$$

La synergie est considérée comme positive (présence de synergie) si $\text{FICI} \leq 1$ et négative (absence de synergie) si $\text{FICI} > 1$.

La synergie entre l'imipénème et la bactériocine est détectée chez les souches : *Klebsiella pneumoniae* nasey, *Acinetobacter baumannii* OXA-58 et *Acinetobacter baumannii* OXA-24, *Pseudomonas aeruginosa* 76119, *E.coli* ATCL.

Les résultats de la synergie sur les microplaques sont montrés dans les figures 6, 7 et 8.

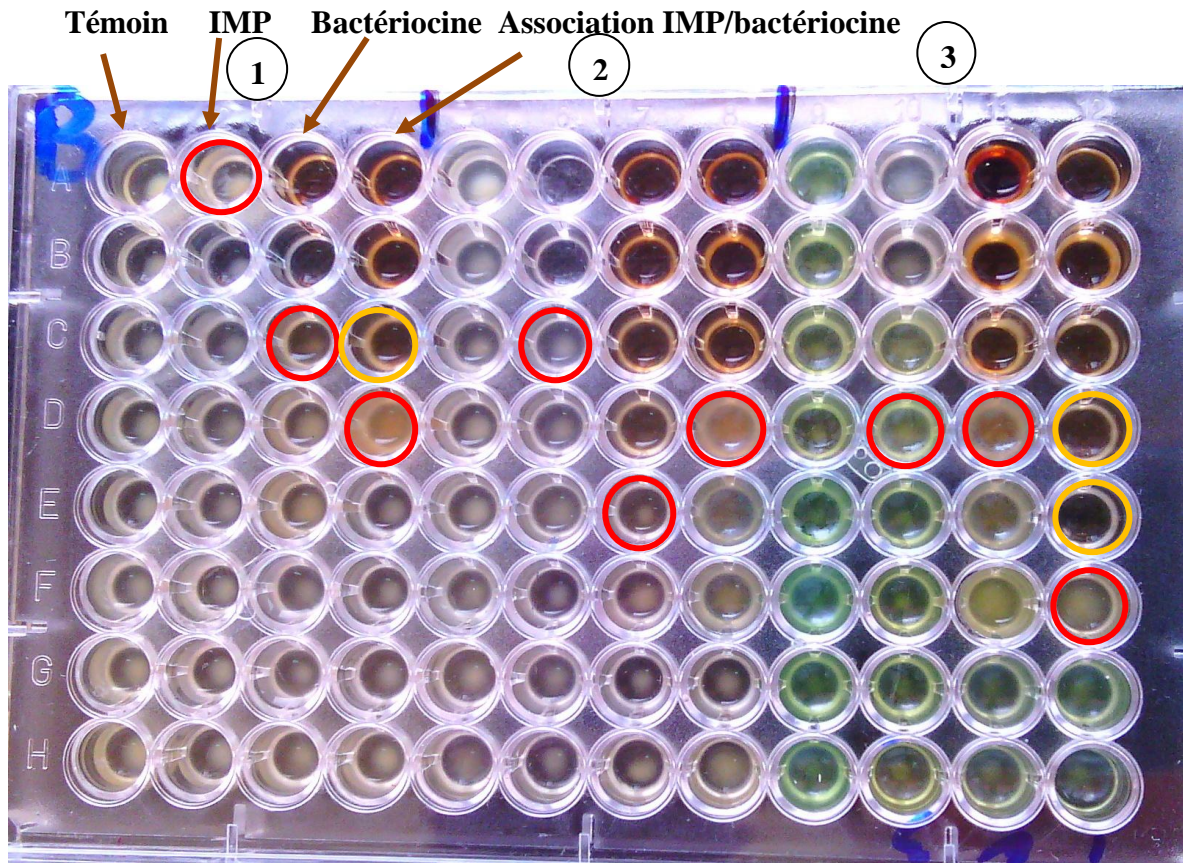


Figure 6 : Test de synergie de l'imipenème et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* chez les souches : (1) : *Klebsiella pneumoniae* nasey, (2) : *Klebsiella pneumoniae* VIM, (3) : *Acinetobacter baumannii* OXA-58 .

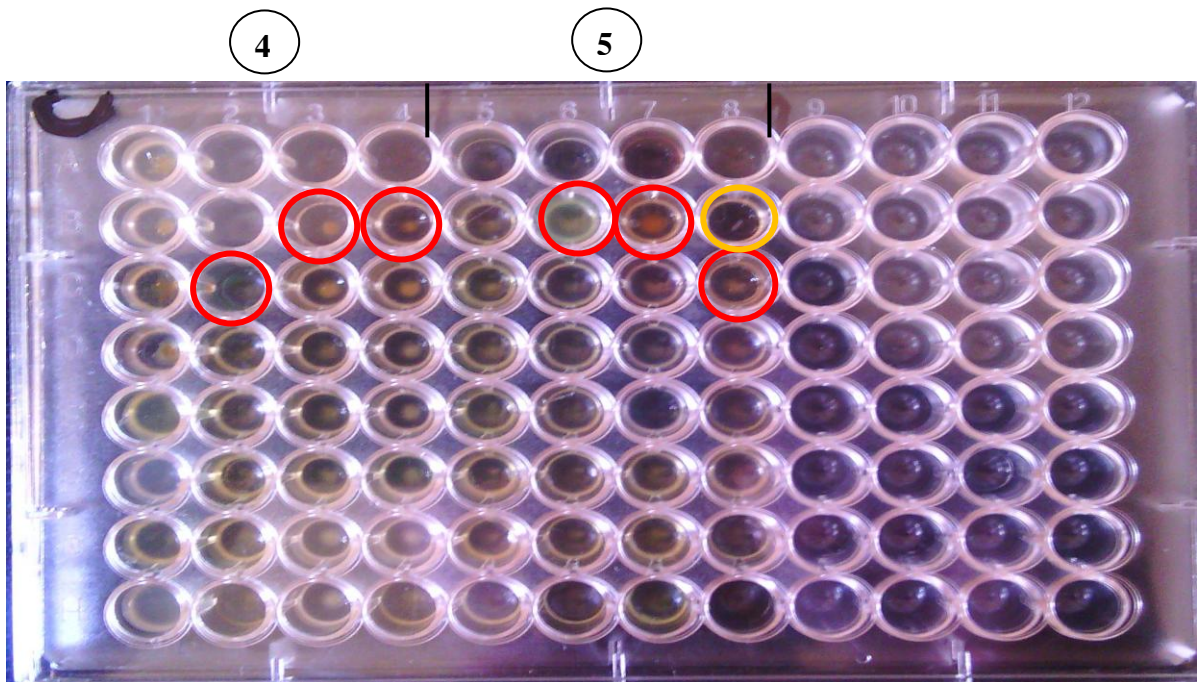


Figure 7 : Test de synergie de l'imipénème et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* chez les souches : (4) : *Klebsiella pneumoniae* 144, (5) : *pseudomonas aeruginosa* 76119.

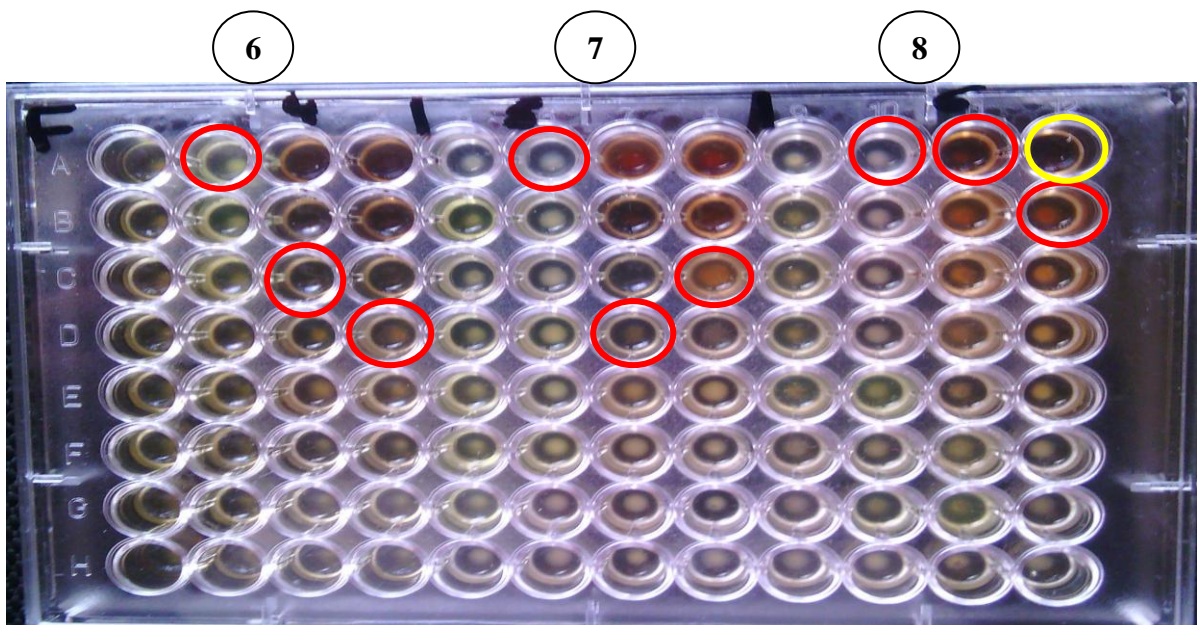


Figure 8 : Test de synergie de l'imipénème et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* chez les souches (6) : *Acinetobacter baumannii* OXA-24, (7) : *E. coli* OXA-48 , (8) : *E. coli* ATCL.

Les résultats obtenus ont montré que la synergie entre l'imipénème et la paracaseicine A a permis de réduire les CMI de l'imipénème. Cette réduction est différente d'une souche à une autre. Le taux maximal de réduction est révélé chez *Acinetobacter baumannii* OXA-58 ou l'association de la bactériocine à l'imipénème a permis de réduire la CMI de ce dernier de 128µg/ml (imipénème seul) à 1µg/ml, avec un facteur de réduction égale à 128 fois. Cependant, un taux de réduction plus faible est observé chez *Acinetobacter baumannii* OXA-24 et *Klebsiella pneumoniae* nasey ou la CMI de l'imipénème est passé de 128µg/ml (imipénème seul) à 4 µg/ml (imipénème associé à la bactériocine) avec un facteur de réduction égale à 32 fois. De plus, un effet synergique très faible est noté chez *pseudomonas aeruginosa* 76119 et *E.coli* ATCL avec un facteur de réduction égale à 2 fois pour chacune des souches.

Tableau IV: Les résultats de synergie sur les microplaques pour chaque souche.

Les souches	CMI IMI (µg/ml)	CMI SA (UA)	CMI IMI dans le mélange (µg/ml)	CMI SA dans le mélange (UA)	FICI	Facteur de réduction	Synergie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> nasey	128	1	4	0,5	0,53	32	Présence
<i>Klebsiella pneumoniae</i> VIM	8	1	4	2	2,5	0	Absence
<i>Acinetobacter Baumannii</i> OXA-58	128	1	1	0,25	0,25	128	Présence
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 144	8	1	16	1	3	0	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 76119	16	1	8	0,5	1	2	Présence
<i>Acinetobacter baumannii</i> OXA-24	128	1	4	0,5	0,53	32	Présence
<i>E.coli</i> OXA-48	64	1	64	1	2	0	Absence
<i>E.coli</i> ATCL	32	2	16	1	1	2	Présence

Plusieurs espèces d'entérobactéries sont naturellement résistantes à plusieurs β -lactamines comme les aminopénicillines, les carboxypénicillines et quelques céphalosporines de la première génération (CA-SFM 2010). A ces résistances naturelles, s'ajoutent les nouvelles résistances acquises, qui sont à l'origine des échecs thérapeutiques et la cause d'un sérieux problème de santé publique (Thomson et al., 2005).

Les bactéries à Gram négatif, comme les entérobactéries, les *Pseudomonas* et les *Acinetobacter*, qui résistent à des antibiotiques puissants comme les carbapénèmes signifie qu'elles peuvent être résistantes aussi à la majorité des autres β -lactamines largement utilisées en thérapeutique (Bujdakova et al., 1998 ; Livermore et al., 2006).

Le traitement des infections causées par ces bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est limité aux quelques aminosides et quinolones, qui sont la dernière ligne de défense (Geoff, 2005 ; De Lencastre et al., 2007). Ces bactéries multi-résistantes aux antibiotiques sont souvent impliquées dans les infections nosocomiales et compliquent le traitement des patients (Thomson et al., 2005 ; Woodford et al., 2009). La situation devient plus grave lorsque le patient souffre d'une insuffisance rénale ou hépatique ou bien d'une allergie aux antibiotiques suscités (Kalogeromitros, 2004 ; Thomson et al., 2005).

Par conséquent, il est clair que trouver un autre moyen de traiter ces infections est d'une importance majeure pour la santé publique. Parmi les alternatives à proposer est l'association de ces antibiotiques à d'autres substances antibactériennes à fin de réduire leur CMI, en étudiant l'effet synergique entre ces substances et les antibiotiques vis-à-vis des souches multi résistantes. Les composés antibactériens utilisés dans ce travail étaient l'imipénème et la paracaseicine A. L'extraction de cette bactériocine est réalisée par une chromatographie en phase inverse C18.

Le test d'activité de la fraction 30% à l'égard d'*E.coli* a montré une bonne activité antibactérienne, d'après Bendjeddou et al., (2012), la fraction 30% d'acétonitrile présente une importance majeure, due à la présence d'une bactériocine, car d'un côté, les autres composés antibactériens comme les acides organiques essentiellement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl sont des petites molécules hydrophiles éluées dans la

solution de lavage ou tout au moins dans les fractions 10 et 20 %. Par ailleurs, la paracaseicine est éluée à 30 % d'acétonitrile.

En raison de leur grande diversité structurale, les bactériocines peuvent affecter différentes fonctions essentielles de la cellule cible comme la biosynthèse de la paroi cellulaire, mais la plupart d'entre elles agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles, ce qui conduit à la mort cellulaire (Twomey *et al.*, 2002).

Ainsi, la sensibilité à la bactériocine, de ces bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, fait d'elle un atout, qui peut jouer un rôle non négligeable pour l'amélioration de la santé humaine.

Les résultats de l'association de l'imipénème à la paracaseicine ont montré que cette association a provoqué une synergie entre ces deux composés antibactériens chez 5 souches sur 8 étudiées. Cette synergie a permis de réduire la CMI de l'imipénème. Cette réduction est révélée chez *Acinetobacter baumannii* OXA-58 avec un facteur égale à 128 fois chez *Acinetobacter baumannii* OXA-24 et *Klebsiella pneumoniae* nasey avec un facteur de réduction égale à 32 fois pour chacune de ces espèces.

La synergie entre l'imipénème et la paracaseicine peut être expliquée par plusieurs mécanismes :

- La formation de pores transmembraires par la bactériocine chez la bactérie résistante à l'imipénème aboutit à la perméabilité de la membrane externe et entraîne le passage de l'antibiotique à travers ces pores, ce qui conduit à la sensibilité de cette bactérie à l'imipénème. Cette souche devient sensible à l'imipénème car la formation de pores par la bactériocine a contré les mécanismes de résistance aux antibiotiques par imperméabilité.
- Les autres mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être contrés, aussi par le phénomène de la formation de pores comme le système de pompes à efflux car les molécules de l'antibiotique expulsé par la pompe, rentrent dans la cellule à travers les pores formés par la bactériocine.

- Pour les souches résistantes par production des carbapénèmases , ce mécanisme pourrait être aussi perturbé par la formation de pores, provoqués par la bactériocine à cause du stress cellulaire, que la bactérie subit suite à la formation de ces pores (la cellule consomme plus d'énergie pour récupérer les molécules échappés par les pores),en plus, le passage d'un nombre élevé de molécules d'antibiotiques par les pores provoque la saturation de l'enzyme du fait que cette dernière ne peut pas dégrader toutes les molécules d'antibiotiques à une vitesse suffisante pour procurer une résistance à l'antibiotique.
- Les bactériocines peuvent aussi exercées leur effet bactéricide par liaison au lipide II sans formation de pores ce qui inhibe la synthèse de la paroi (Hasper *et al.*, 2006).

Dans cette étude, l'effet synergique entre l'imipénème et une bactériocine a été étudié.

parmi les souches résistantes à l'imipénème étudiées, deux appartenant à l'espèce *Acinetobacter baumannii* caractérisés par production d'une carbapénémase de type OXA-24 et OXA-58 et 3 souches de *Klebsiella pneumoniae* caractérisés par production d'une carbapénémase de type VIM, KPC-1, KPC-3 et deux souches d'*Escherichia coli*, une est caractérisée par production d'une carbapénémase de type OXA-48 et l'autre sensible et *Pseudomonas aeruginosa*, ces souches présentent des CMI supérieurs ou égale à 64µg/ml.

L'association de l'imipénème à une bactériocine produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* a révélé des effets synergiques contre des bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques.

La synergie entre l'imipénème et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* a permis de réduire les CMI de l'imipénème, cette réduction est différente d'une souche à une autre. Le taux maximal de réduction est révélé chez *Acinetobacter baumannii* OXA-58 ou l'association de la bactériocine à l'imipénème a permis de réduire la CMI de ce dernier de 128µg/ml (imipénème seul) à 1µg/ml, avec un facteur de réduction égale à 128. Cependant, un taux de réduction plus faible est enregistré chez *Acinetobacter baumannii* OXA-24 et *Klebsiella pneumoniae* nasey ou la CMI de l'imipénème est passé de 128µg/ml (imipénème seul) à 4 µg/ml (imipénème associé à la bactériocine) avec un facteur de réduction de 32. La synergie la plus faible est rencontrée chez *E.coli* ATCL et *Pseudomonas aeruginosa* 76119 avec un facteur de réduction égale à 2 fois.

En perspectives, les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- Elargir l'étude sur d'autres bactéries à Gram négatif et positif.
- Des tests de synergie en utilisant la bactériocine pure pour confirmer les résultats obtenus.
- Déterminer la CMI de la bactériocine permettant d'avoir une synergie maximale. autrement dit, la réduction de la CMI de l'imipénème à des valeurs ≤ 2 .

Références bibliographiques

A

- Albano,H,Pinho,C.,Leite,D.,Barbosa,J.,Silver,J.,Carneiro,L.,Magalhaes,R.(2009). Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. *Food Control*, 20:764 - 770.
- Alexandro Rodríguez-Rojas, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Alejandro Couce, Jesús Blázquez. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. (2013).

B

- Bendjeddou K, Michel Fons, Pierre Strocker et Djamilia Sadoun. (2012). Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens.
- Bujdakova H., Lausova A., Jankovicova S., Prodinge W., Kallova J., Milosovic P. et Kettner M. (1998). Study of β -lactam resistance in ceftazidime-resistant clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 10:135-141.

C

- Chang-Ro lee, Hwan Cho, Byeong Chul Jeong, et Sang Hee. (2015). les stratégies pour réduire la résistance aux antibiotiques.
- Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Norme n°2 : Méthode de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. (Version 2, 1995).
- Cuzon G., Naas T., Guibert M. et Nordmann P. (2010). In vivo selection of imipénème resistant *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX M-15 and plasmid-encoded DHA-1 céphalosporinase. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **35**: 265-268.

D

- De Lencastre H., Duarte O. et Tomasz A. (2007). Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol*, 10:428–435.
- Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol.Agron.Soc. Environ* ,13 : 143-154.

F

- Frasca D., Dahyot- Fizelier C. et Mimoz O. (2008).la colistine en réanimation. *Réanimation*; 17:251-258.

G

- Geoff S. (2005). Antibiotic resistance. *Medicine*, 33: 47-51.
- Grall N., Muller-Serieys C. (2013). Carbapénèmes.

H

- Hasper H.E., Kramer N.E., Smith J.L., Hillman J.D., Zachariah C., Kuipers O.P., de Kruijff B. et Breukink E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313:1636 – 1637.
- Hemaishwarya S, Kruthiventi AK, Double M. (2008) .La synergie entre les produits naturels et des antibiotiques contre les maladies infectieuses.

J

- Jabar MA, Al-Mossawi A. (2010). Sensibilité de certaines bactéries résistantes à plusieurs extraits d'ail.
- Juste J Richard et Yitzhak Tor. Les antibiotiques et la résistance bactérienne au 21e siècle.2014

K

- Kalogeromitros D. (2004). Penicillin hypersensitivity: value of clinical history and skin testing in daily practice. *Allergy Asthma. Proc.*, 25:157-160.

- Kruszewska D, et al.2004. mersacidine éradique *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline (SARM) dans un modèle de souris de la rhitine.J.Antimicrob.Chemother. 54 : 648-653 .

L

- Livermore DM.Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems.J Antimicrob Chemother 2001; 47:247-50.
- Livermore D.M. et Woodford N. (2006). The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.*, 14:413-420

N

- Naghmouchi k ,John Baah ,Didier Hober , Eric Jouy , Cédric Rubrecht , Famara Sané , et Djamel Drider . (2013). Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential To Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells.
- Nordmann P. (2014). Carbapénémase entérobactéries productrices: Présentation d'un défi majeur de santé publique.
- Nordmann P. Poirel L. (2009). *Acinetobacter baumannii*: basic and emerging mechanisms of resistance. *Eur infect*; 2: 94-7.
- Nordmann P. (2010). Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Medecines/Sciences*. 26 (11), 950-959.

Q

- Queenan A. M., Bush K. (2007). Carbapénémases: les β -lactamases polyvalents. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 : 440 - 58, la table des matières.
- Thomson J.M. et Bonomo R.A. (2005). The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8:518–524.
- Todorov, S.D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G., Franco, B.D.G.M. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)-from isolation to application : characterization of a bacteriocin .*Food Res.Int.*, 44:1351-1363.

- Torres J. A., Villegas M. V., Quinn J. P. (2007). Les concepts actuels de bactéries résistantes aux antibiotiques Gram négatif *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 5 : 833 – 843.
- Twomey D., Ross R.P., Ryan M., Meaney B. et Hill C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82:165–185.

W

- Woodford N. et Livermore D.M. (2009). Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J. Infect.*, 59: S4–S16.

Z

- Zarilli R., Giannouli M., Tomasone F., Triassi M. et Tskris A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic facteurs of an emerging.

Annexe I :

Composition des milieux de culture :

Tableau N°I : Bouillon nutritif (PH =7,2).

Composition	Quantité g/l
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Extrait de viande	10

Tableau N°II : Gélose Mueller Hinton (PH= 7,3).

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	3
Hydrolysant de caséine	17,3
Amidon	1,5
Agar	16

Tableau N°III: Gélose nutritive (Ph = 7).

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

Tableau N°IV : Bouillon MRS (PH = 6,4).

Composition	Quantité g/l
Polypeptone	10
Extrait de viande	10
Extrait autolytique de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

Tableau N°V : Bouillon Mueller Hinton (PH= 7,3).

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	3
Hydrolysant de caséine	17,5
Amidon	1,5

Annexe II

Tableau N°I : Résultats des CMI.

Les souches	CMI µg/ml
<i>E. coli</i> ATCL	32
<i>Acinetobacter baumannii</i> OXA-58	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> VIM	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> nasey	>64
<i>Acinetobacter baumannii</i> OXA-24	>64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 144	>64
<i>Esherichia coli</i> OXA- 48	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 76119	64

Tableau N°II : Diamètres des zones d'inhibition édités par le CFA-SFM, 2014 :

Antibiotique	Abréviation	La charge (µg)	Ø critique (mm)		Concentration Critique µg/ml	
			S	R	S	R
Imipenème	IMI	10µg	≥22	<16	≤2	>8

Résumé :

L'association de l'imipénème à une bactériocine produite par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a montré un effet synergique à l'égard des souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes par production des carbapénémases de type KPC, OXA et VIM. Ces souches sont résistantes à l'imipénème avec des CMI allant de 32 µg/ml à plus de 64 µg/ml. Cette synergie a permis de réduire les CMI de l'imipénème, le taux maximal de réduction est révélé chez *Acinetobacter baumannii* OXA-58, où l'association de la bactériocine à l'imipénème a permis de réduire la CMI de ce dernier de 128 µg/ml à 1 µg/ml avec un facteur de réduction égale à 128 fois. Cependant, un taux de réduction plus faible est noté chez *Acinetobacter baumannii* OXA-24 et *Klebsiella pneumoniae* nasey où la CMI de l'imipénème est passé de 128 µg/ml à 4 µg/ml avec un facteur de réduction égale à 32 fois. Néanmoins, le taux le plus faible est révélé chez *Pseudomonas aeruginosa* 76119 et *E. coli* ATCL avec un facteur de réduction égale à 2 fois.

Mots clés : bacilles à Gram négatif, CMI, bactériocine, imipénème, synergie, multi-résistance aux antibiotiques.

Summary:

The combination of imipenem to a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, showed a synergistic effect against Gram-negative bacilli strains resistant to carbapenems by producing carbapenemases type KPC, OXA and VIM. These strains are resistant to imipenem with MICs ranging from 32 µg / ml to more than 64 µg/ml. This synergy has reduced the MIC of imipenem, the maximum rate of reduction was found in *Acinetobacter baumannii* OXA-58 where the association of the bacteriocin to imipenem allowed a decrease of the MIC of the antibiotic from 128 µg/ml to 1 µg/ml with a reduction factor of 128 times. However, a low reduction rate was noted in *Acinetobacter baumannii* OXA-24 and *Klebsiella pneumoniae* nasey where imipenem MIC decreased from 128 µg / ml to 4 µg/ml with a reduction factor of 32 times. Nevertheless, the lowest rate was found in *Pseudomonas aeruginosa* 76119 and *E. coli* ATCL with a reduction factor of 2 times.

Keywords : Gram-negative bacilli, MIC, bacteriocin, imipenem, synergy, antibiotic multi-resistance

