

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Abderrahmane Mira Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

*Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du
Master en Microbiologie Moléculaire et Médicale*

Thème

*Contribution à l'étude de l'effet
synergique de l'imipenème associé à
une bactériocine produite par
Lb.paracasei subsp paracasei à
l'égard des bactéries multirésistantes*

Réalisé par : M^{elle} CHENA Basma

M^{elle} MERZOUGUI Meriem

Membres du jury :

Président : Pr. TOUATI. A Professeur

Promoteur: Mr Bendjedou K. MCB

Co-Promoteur : M^{me} Gharout A. MAA

Examineur : M^{elle} YANAT B. MAA

Examineur : M^{elle} TAFOUKT R. MAB

Promotion 2013/2014

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....01

Matériel et Méthodes

I.	Souches bactériennes	05
II.	Détermination des CMI des bacilles à Gram négatif vis-à-vis de l'Imipenème en milieu solide.....	05
III.	Recherche de la production de carbapénémases	07
IV.1.	Test de Hodge modifié	07
IV.2.	Recherche la production de métallob β -lactamases (MBL).....	07
IV.3.	Recherche la production des <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC).....	08
IV.	Revivifications de <i>Lactobacillus paracasei</i> subspp <i>paracasei</i>	08
V.	Vérifications de l'activité antibactérienne de <i>Lb paracasei</i> subspp <i>paracasei</i>	09
VI.	Extraction des substances antimicrobiennes produit par <i>Lb paracasei</i> subspp <i>paracasei</i>	09
VII. 1.	La dialyse	09
VII.2.	la chromatographie	10
VII.	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de <i>Lb.paracasei</i> à l'égard des souches résistantes aux antibiotiques	10
VIII. 1.	Méthode des puits	10
VIII. 2.	Méthode des spots	10
VIII. 3.	Méthode des disques	11
VIII.	Teste de synergie bactériocine imipenème	11
	IX. 1 Test de synergie sur milieu solide	11
	IX. 2. Test de synergie sur milieu liquide	11
	12

Résultat

I.	Recueil des souches bactériennes.....	13
II.	Détermination de la CMI	13
III.	Analyse de phénotypes de résistances	14
	III.1Recherche de la production des carbapénémases	14
	III.2Recherche de métallo- β - lactamase.....	15
	III. 3 Recherche de la production de KPC.....	15
IV.	Mise en évidence de l'effet antimicrobien de <i>Lb.paracaseisubsp.pracasei</i> à l'égard d' <i>E.coli</i>	16
V.	Extraction des substances antibacteriennes produites par <i>Lb.paracaseisubsp.pracasei</i>	17
VI.	Test de la synergie bactériocine antibiotique.....	18
	VIII.1.Test de synergie sur les milieux solide.....	18
	VIII.2 ; Test de synergie sur milieux liquide.....	19
	Discussion	23
	Conclusion.....	28

Références bibliographiques

Annexe



Remerciement

« Louange à Allah pour m'avoir donné le courage pour réaliser ce travail »

Nous adressons mes vifs remerciements à notre promoteur, Dr BENDJEDDOU Kamel et à notre Co-promotrice M^{me} Gharout Alima pour leur encadrement. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

Nous remercions également Pr TOUATI A/Aziz pour et sa collaboration dans la réalisation de ce travail.

Nous remercions les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons également à remercier les membres de l'équipe du Pr TOUATI « Equipe de la Résistance » : Mr BAKOUR, M^{elle} TAFUKT, M^{elle} YANAT, Mr BELMEHDI, M^{elle} BACHIRI, M^{elle} katia et l'ingénieur M^{me} RAHMANI pour leurs aide incontournable et leurs conseils. Qu'elles retrouvent ici notre plus sincère reconnaissance.

Enfin, toute nous gratitude à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce document.



Ce modeste mémoire est dédié à... ✍️

Ma maman : Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Tes prières m'ont été d'un grand secours dans ma vie. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu as consentis depuis ma naissance,

Mon papa : Aucune dédicace ne saura exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi. Rien au monde n'est à la mesure des efforts que tu as fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices.

Papa Maman : Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher frère Fayssal et mes chères soeurs : Asma, Roumisa et lyna. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte, je vous souhaite un avenir radieux

A mon chère fioncé Abd el malek et mes beaux parents, mes beaux frères et mes belles soeurs pour leurs encouragement, soutient et priers pour que je réussisse dans ma vie.

A tout ma famille paternelle et maternelle: MERZOUGUI, GHOUBANE et BENDJEDDOU, pour leurs soutien, leur amour, et leurs encouragements.

A ma chère soeur, copine, mon binome besma et sa chère famille A mes très chers amies :Souad, Nawal, Yasmina, chahina, kahina, dalal, hanya. En témoignage de l'amitié qui nous unie et des souvenirs de tous les moments qu'on a passé ensemble, je vous dédie ce travail et vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur

A toute la promotion master II MMM 2013/2014



Ce modeste mémoire est dédié à...

Ma maman : Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Tes prières m'ont été d'un grand secours dans ma vie. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu as consentis depuis ma naissance,

Mon papa : Aucune dédicace ne saura exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi. Rien au monde n'est à la mesure des efforts que tu as fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices.

Papa Maman: Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes chers frères Mouloud et rachid et mes chères soeurs: Hassina, Nadjat, et Saliha. et mes belles soeurs Peggy et Yasmina Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte, je vous souhaite un avenir radieux

A mon chère fioncé Mourad et mes beaux parents, mes beaux frères et mes belles soeurs pour leurs encouragement, soutient et priers pour que je réussisse dans ma vie.

A tout ma famille paternelle et maternelle: chena pour leurs soutien, leur amour, et leurs encouragements.

A ma chère soeur, copine, mon binome Meriem et sa chère famille

*A mes très chers amis :chabha, zina,chahina, kahina, dalal,hanya.
En témoignage de l'amitié qui nous unie et des souvenirs de tous les moments qu'on a passé ensemble, je vous dédie ce travail et vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur*

A toute la promotion master II MMM 2013/2014

basma

Liste des abréviations

- AmcC** : Adénosine Monophosphate Cyclique.
- ATB** : Antibiotique.
- ATCC** : American type culture collection
- bla** : beta-lactamase-encoding gene.
- BLSE** : Beta-lactamase à spectre élargi.
- BGN** : bacilles à Gram Négatif.
- BMR** : Bactérie multi résistantes.
- CHU** : centre Hospitalier Universitaire.
- CIT** : Citrate de Simmons.
- CA-SFM** : Comité français de l'antibiogramme.
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- CTX-M** : Céfotaximase-Munich.
- EBLSE** : Entérobactéries productrices d'une β -Lactamase à spectre étendu.
- ECBE** : Examen cytobactériologique des urines.
- EDTA** : Ethylene-Diamine-TetraAcétate.
- EPC** : Entérobactéries productrices de carbapénémases.
- F** : Femme.
- FICI** : Facteur d'indice concentration inhibitrice.
- GES** : Guiana extended spectrum β -lactamase
- Glu** : glucose
- H** : Homme
- H₂S** : Hydrogène Sulfuré.
- I** : Intermédiaire.
- IMI** : Imipenem-hydrolyzing β -lactamase
- IND** : Indole.
- KPC** : *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase.
- LAC** : Lactose.
- LCR** : Liquide Céphalo-rachidien.
- LD** : Laboratoire d'analyse Djamma
- LM** : Laboratoire d'analyse Moilek

Liste des abréviations

MAN : Mannitol

MOB : Mobilité

MH : Mueller Hinton.

MβL : Métallo-β- lactamase.

ND : Non déterminée.

OXA: Oxacillinase.

PV : Prélèvement vaginal

R : Résistant.

RM: Rouge de méthyle.

S : Sensible.

SHV : Sulfhydryl variable.

TDA: Tryptophane désaminase.

TEM : Temoneira. (Résistant aux inhibiteurs).

TSI : ThreeSugar Iron.

UFC : Unité Formant Colonie.

URE: Uréase.

VIM : Verona integron-encoded metallo- β- lactamase

VP: Voges- Proskauer.

Liste des figures

Figure N°1 : Résultat de CMI pour les couches : <i>E. coli</i> , <i>Acinetobacterbaumanni</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Figure N°2: Hodge test positive pour la souche <i>Acinetobacterbaumanni</i> 19.....	14
Figure N°3 : Résultat du test synergie entre l'IMI et EDTA pour la souche <i>Acinetobactersp</i> 06.....	15
Figure N°4: Résultat de test à l'acide boronique avec la souche <i>Acinetobactersp</i> 13.....	16
Figure N°5 : Algorithme utilisé pour la déduction des phénotypes de résistance aux lactamines.....	16
Figure N°6 : Mise en évidence l'effet antibactérien de <i>Lb.paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> à l'égard d' <i>E.coli</i>	17
Figure N°7 : Test d'activité antibactérienne, des différentes fractions obtenus, à l'égard des souches résistantes à l'imipénème en utilisant des différentes méthodes : (1) méthode des spots (<i>Acinetobacterbaumanni</i>), (2) méthode des puits (<i>E.coli</i>), (3) méthode des disques (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	18
Figure N°8: Images de synergie obtenue lors du test de synergie entre la bactériocine et imipénème chez les souches résistantes à l'imipénème.....	18
Figure N°9 : Test de synergie de l'imipénème et la bactériocine produite par <i>Lb.paracasei</i> envers des souches résistantes à l'imipénème : (1): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03, (2): <i>E. coli</i> 12997, (3): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 21, (4) : <i>E.coli</i> 164.....	20

L'avènement de l'antibiothérapie, dans les années 1940, a complètement révolutionné le domaine médical et entraîné une réduction significative de la mortalité associée aux maladies infectieuses. Malheureusement, la résistance bactérienne aux antibiotiques traditionnels a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (Carle., 2009). La résistance des bactéries aux antibiotiques est un sujet émergent depuis que la découverte de nouveaux antibiotiques s'est tarie et que l'augmentation régulière des résistances à ceux qui sont disponibles a avivé les craintes de se trouver bientôt face à des situations où des bactéries pathogènes seraient résistantes à tous les antibiotiques disponibles, induisant des impasses thérapeutiques (Andremont *et al*, 2010). Les bactéries multi-résistantes(BMR) aux antibiotiques sont des bactéries qui ne réagissent qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs (Carle, 2009).

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif, dont les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, constitue un véritable défi (Grall et al, 2011). Les carbapénèmes « l'imipénème, l'ertapénème, le méropénème et le doripénème » sont une classe d'antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines et ayant le spectre d'activité antimicrobienne le plus large. Les carbapénèmes ont un usage exclusivement hospitalier et sont principalement utilisés dans le traitement des infections à bactéries multi-résistantes (Boutet *et al*, 2012). Cette résistance peut être due à des mécanismes chromosomiques (altération de la porine OprD chez *Pseudomonas aeruginosa*), à l'association des mécanismes de résistances (β -lactamases à spectre étendu et/ou céphalosporinases associées à une perte de la perméabilité membranaire chez les entérobactéries) ou à la production d'enzymes hydrolysant les carbapénèmes. Ce dernier mécanisme est le plus inquiétant par le fait que les gènes codant pour ces enzymes appelées carbapénemases sont habituellement situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, intégrons) permettant une dissémination rapide. Ces carbapénemases sont classées au sein des classes A, B et D d'Ambler (Grall *et al*.,2011).

Les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques représentent un problème de santé publique mondiale, de ce fait il est nécessaire de limiter leur diffusion par la recherche de nouvelles agents antimicrobiens et le développement de stratégies innovatrices pour les combattre (Naghmouchi *et al*, 2013).

Les bactériocines sont des polypeptides antimicrobiens synthétisés par des ribosomes. La première bactériocine (Colicine) fut découverte par Gratia en 1952. Elle a été produite par une souche d'*E. coli* dite *E. coli* V qui exerçait un effet antibactérien très spécifique sur une autre souche de la même espèce dite *E. coli* ϕ (Chavan et Riley, 2007).

L'industrie agroalimentaire, entre autres, utilisait à outrance dans les années 50 les antibiotiques médicaux, ce qui a accéléré la résistance bactérienne. Depuis, des restrictions gouvernementales ont été mises en place par plusieurs pays pour essayer de freiner la résistance bactérienne, notamment de limiter et de restreindre l'utilisation des antibiotiques dans le domaine agroalimentaire (Soulsbay, 2007), de ce fait, plusieurs compagnies de production se sont tournées vers l'utilisation des bactériocines, entre autres comme bio-conservateur pour assurer la qualité de leurs produits. Les bactériocines sont, pour la plupart, inodores, sans goût, mais surtout, non toxiques ce qui a mené à leur approbation par la FDA (Food and Drug Administration). Maintenant, les bactériocines prennent une importante partie du marché des suppléments alimentaire (Hassan *et al.* 2012).

Depuis leur découverte, près de 200 bactériocines qui diffèrent de par leur structure et leur mécanisme d'action ont été identifiées (Hammami *et al.* 2007). La plupart d'entre elles ont comme caractéristique d'être très spécifiques envers les espèces bactériennes apparentées à celles qui les produisent. Ainsi, contrairement aux antibiotiques, elles peuvent cibler spécifiquement les bactéries pathogènes sans tuer celles essentielles pour notre système. Cependant, certaines bactériocines possèdent une activité antimicrobienne plus vaste qui peut même s'étendre jusque chez les protozoaires, les levures, les moisissures et même les virus (Raddey et al 2004).

Des expérimentations *in vivo* sur des animaux de laboratoire ont montré l'efficacité de certaines bactériocines dans le traitement de certaines maladies fonctionnelles comme la fibrose kystique et le syndrome de sécheresse oculaire (SSO) (Grasemann *et al.* 2007 ; Kuipers *et al.* 2009).

Arnusch *et al.* (2008) ont montré qu'une molécule hybride composée de la vancomycine et les 12 premiers acides aminés N-terminal de la nisine restaure l'activité de cet antibiotique contre les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). D'un autre côté, l'injection intramammaire de la Nisine et de la lysostaphine chez des vaches laitières atteintes de mammite,

assure une guérison de 66% des cas pour *Staphylococcus aureus*, 95% des cas pour *Streptococcus agalactiae* et 100% des cas pour *Streptococcus uberis* (Sears et al.1992).

D'après Kruszewska *et al.* (2004), la Mersacidine inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) chez des souris immunodéprimées atteintes de rhinite. Cette bactériocine inhibe la synthèse de la paroi chez les bactéries d'une efficacité égale à celle de la vancomycine. D'autres bactériocines, comme l'epidermine, la gallidermine et la lacticine 3147 présentant une activité antibactérienne contre des SARM et des ERV, ont prouvé leur efficacité dans le traitement des infections cutanées (Galvin *et al.*, 1999).

Suite à ces travaux, certaines bactériocines comme la nisine et la lacticine 3147 sont autorisés pour être utilisés comme agents antimicrobiens pour lutter contre les infections bactériennes, surtout celles provoquées par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, dans les domaines médical et vétérinaire. Ainsi, la nisine et la lacticine 3147 sont utilisées comme agents antibactériens dans des produits de nettoyage et de protection des mamelles pour lutter contre les mammites chez les vaches laitières (Cotter *et al.*, 2005). Les firmes Astra et Merck ont commercialisé la nisine pour traiter les ulcères gastriques dus à *Helicobacter pylori* (Dicks *et al.*, 2011).

Des rapports sur l'utilisation thérapeutique des bactériocines comme la pédiocine PA-1 et piscicoline 126 ont été publiés. La pédiocine PA-1 purifiée offre une protection anti-*Listeria monocytogenes* une fois administré par voie oral chez des souris (Dabour *et al.* 2009). L'administration intraveineuse de la piscicoline 126, manifeste chez des souris, une activité anti-*Listeria* au niveau de différents tissus infectés (Ingham *et al.* 2003).

Des travaux menés par Naghmouchi *et al.* (2010a) ont montré que 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 la diminution de la CMI cette antibiotique de 0.12µg/ml à 0.03 µg/ml chez *E. coli*.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui consiste en l'étude de l'effet de l'association de l'imipenème à une bactériocine produit par *Lb. paracasei* subsp *paracasei*, sur la résistance aux antibiotiques de certains bacilles à Gram négatif.

I. Souches bactériennes :

Durant la période décembre 2013 à mars 2014, nous avons collectés des souches de bacilles à Gram négatif résistantes au niveau du laboratoire du Centre Hospitalo-universitaire de BATNA et des laboratoires d'analyse Médicales DJAMA et MOUALEK de la wilaya de Bejaia.

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies :

- ✓ Sexe de patient
- ✓ Age du patient
- ✓ Type de prélèvement

Les souches bactériennes collectées ont été identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie de CHU de Batna et au niveau des laboratoires d'analyse médicales DJAMA et MOUALEK.

Une purification et ré-identification au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université de A/MIRA, Bejaia.

Une souche de lactobacilles appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA) de l'université de Bejaia est utilisée dans les tests de synergie. Cette souche est déjà identifiée par séquençage de l'ADNr 16s est conservée à -18°C dans du bouillon MRS à 20% de glycérol.

Une souche *d'acinetobacter baumannii* à la collection du laboratoire du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA).

II. Détermination des CMI des bacilles à Gram négatif vis-à-vis de l'Imipenème en milieu solide :

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'Imipenème, envers les 40 souches collectées, sont déterminées par la méthode de dilution en milieu solide. Ainsi, la poudre d'antibiotique est dissoute dans de l'eau physiologie stérile, à partir de cette solution, des dilutions sont effectués. Les dilutions utilisées sont résumés dans le tableau I:

Tableau I : préparation de la gamme d'antibiotiques (CASFM, 1995 version 2)

Solution initiale (mg/l)	Volume prélevé (ml)	Volume de diluant (ml)	Concentration obtenue (mg/l)	Finale dans la gélose (mg/l)
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

- **Préparation des boîtes**

18 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont additionnés séparément de 2 ml de chacune des différentes concentrations de l'imipénème. Après homogénéisation, les boîtes sont séchées 30 minutes à l'étuve.

- **Ensemencement des boîtes**

Une suspension bactérienne est préparée en dissociant 3 à 5 colonies dans 3 ml d'eau physiologique stérile et une dilution de 10^{-2} est réalisée (10^7 UFC/ml). 10 μ l (10^4 UFC/ml) de cette dilution sont déposés sur le milieu par spot en deux répétitions. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h. La souche *E. coli* ATCC 25922 est utilisée comme témoin négatif.

- **Lecture**

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une à deux colonies ou d'un film n'est pas prise en considération. (CASFM, 1995 versions 2).

III. Recherche de la production de carbapénémases :

IV. 1-Test de Hodge modifié :

Ce test est réalisé afin de mettre en évidence la production d'une carbapénémase pour les souches qui présentent une résistance ou une sensibilité diminuée aux carbapénèmes, le test est réalisé comme suit (Lee *et al*, 2010)

- Une souche d'*E. coli* de référence ATCC25922 (sensible) est ensemencée par Écouvillonnage sur gélose Mac Conkey à partir d'une suspension à 0,5 McFarland.
- Un disque d'imipénème est déposé au centre de la boîte, puis chaque souche à tester est ensemencée par stries à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte en présence d'un témoin positif et d'un autre négatif
- Après une nuit d'incubation à 37 °C, la déformation du diamètre de la zone d'inhibition à l'intersection entre la strie et la culture d'*E. coli* indique la production d'une carbapénémases (par la souche testée) qui hydrolyse l'imipénème .

IV. 2- Recherche de la production de métallo β -lactamases M β L

- **Test d'inhibition à l'EDTA**

La production d'une M β L est recherchée en utilisant une solution stérilise d'EDTA à 0,5M pH 8. Dans ce but, deux méthodes ont été utilisées :

- ✓ **Méthode des disques combinés**

- Deux disques d'imipénème sont déposés séparément sur la gélose MH dans la même boîte.
- 5 μ l de la solution d'EDTA sont déposés sur l'un des disques.
- Après 24h d'incubation à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition autour des deux disques sont comparés.

Un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque imipénème + EDTA par rapport au disque d'imipénème seul. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul, d'au moins 6mm, sont considérées comme souches productrices de M β L (Yong *et al*, 2002).

✓ Recherche de synergie

Un DD-test est réalisé avec un disque d'imipénème (10µg) et un disque imbibé avec 10µl de solution d'EDTA à 0,5M distant de 15mm (Jeong *et al*, 2006). La présence d'une MβL est détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA.

IV.3- Recherche de la production de KPC :

La production d'une KPC est recherchée en utilisant une solution stérile d'acide boronique.

✓ Méthode des disques combinés

- Deux disques d'imipénème sont déposés séparément sur la gélose MH dans la même boîte.
- 20µl de la solution d'acide boronique sont déposés sur l'un des disques.
- Après 24h d'incubation à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition autour des deux disques sont comparés.

Un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque imipénème + acide boronique par rapport au disque d'imipénème seul. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-acide boronique est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul, d'au moins 6mm, sont considérées comme souches productrices de KPC (Doi, 2008).

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

La revivification de la souche *Lb. paracasei* a été réalisée par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention d'une culture fraîche en phase exponentielle de croissance.

L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24h à 72h. La revivification est effectuée par au moins 3 repiquages successifs pour cette souche.

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

La souche de lactobacilles utilisée dans cette étude est connue pour son effet anti-*Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) (Bendjeddou et al. 2012). Ainsi, la vérification de son activité antibactérienne a été réalisée à l'égard d'*E. coli*.

Un tube de 9ml de bouillon MRS a étéensemencé par 1ml d'une culture fraîche de 24h/37°C de *Lb. Paracasei subsp paracasei*, puis incubé à 37°C pendant 18h. Après incubation, les cellules ont été éliminées par centrifugation à 12000g pendant 20min à 4°C.

Le surnageant obtenu est concentré sous vide en utilisant un évaporateur rotatif à 40°C. L'activité antibactérienne du surnageant concentré obtenus est testée sur gélose Muller Hinton suivant la méthode des puits de décrite par Cintas et al. (1995). Ainsi, une boîte de pétri a étéensemencée avec une culture de 18h d'*E coli* à 10⁶ UFC/ml. La boîte est laissée sécher 15min à température ambiante, ensuite, un puits a été creusé dans la gélose à l'aide d'un emboué stérile. 25ul du surnageant concentré ont été déposés dans le puits, la boîte est ensuite pré-incubée pendant 2 heures à 4°C afin d'arrêter la croissance du germe cible et de permettre la diffusion des agents inhibiteurs dans la gélose, puis elle est incubée à 37°C/24h. L'activité antibactérienne est révélée par la présence d'une zone d'inhibition autour du puits.

VII. Extraction des substances antimicrobiennes produites par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* :

Un tube de 9ml du bouillon MRS estensemencé par 1ml d'une culture fraîche de 24h/37°C de *Lb. Paracasei subsp. paracasei* puis incubé à 37°C pendant 18h. Deux flacons de 200ml du bouillon MRS ont étéensemencés à 2% avec cette pré-culture contenant, puis incubés à 37°C pendant 24h. Les cellules ont été éliminées par centrifugation à 1200g pendant 20min à 4°C.

VII .1-Dialyse :

D'après Bendjeddou et al. 2012, la souche de lactobacilles, utilisée pour réaliser ce travail, produit une bactériocine de faible poids moléculaire (2,5 KDa). Afin de séparer cette bactériocine des grosses protéines du milieu de culture, une dialyse a été effectuée.

Pour ce faire, 25 ml de surnageant concentré est dialysé contre 1,5L de tampon citrate phosphate à 0,5M pH 4,5 pendant 24h à 4°C en utilisant un boudin de dialyse ayant un seuil de séparation de 5KDa. Le liquide de contre dialyse obtenu est concentré sous vide jusqu'à avoir le même volume du dialysat (25 ml). Le dialysat et le liquide de contre dialyse sont testés pour leur activité antibactérienne à l'égard d'*E coli*.

VII .2. Chromatographie en phase inverse :

L'extraction de la bactériocine produite par *Lb. Paracasei* subsp. *paracasei* est réalisée par chromatographie en phase inverse en utilisant une colonne de gel de silice C₁₈ (supelo 10g-60, USA) selon la méthode décrite par Bendjeddou et *al.* (2012) (Fig.). Pour ce faire, deux solvants organiques sont utilisés, le TFA (acide trifluoroacétique à 0,05% dans l'eau) et l'acétonitrile. Avant utilisation, la colonne a été d'abord équilibrée selon les recommandations du fabricant ; ainsi, elle a été lavée avec 120ml de TFA à 0,5%, puis avec 120ml d'acétonitrile et en fin elle est rééquilibrée avec 120 ml de TFA pour la remettre aux conditions initiales.

25 ml du liquide contre dialyse concentré sont passés à travers la colonne avec un débit de 2ml/min. la colonne a été ensuite lavée avec 120ml de TFA pour éliminer les substances qui ne sont pas accroché au gel. L'élution a été assurée par des solutions de 120ml contenant un gradient ascendant d'acétonitrile, dans le TFA à 0,05, allant de 0% jusqu'à 50%. Enfin, la colonne est lavée avec 120ml d'acétonitrile .

VIII. Mise en évidence de l'activité antibactériennes de *Lb. Paracasei*

à l'égard des souches résistantes à l'imipenème :

L'activité antibactérienne des fractions obtenues par dialyse et celles obtenues par chromatographie est déterminée, à l'égard des souches résistantes aux antibiotiques, par 3 méthodes :

a) Méthodes des puits :

L'activité antimicrobienne des fractions obtenues est réalisée dans les conditions décrites précédemment.

b) Méthode des spots :

Des spots de 25µl des fractions suscitées sont, séparément déposée sur des géloses Muller Hinton (MH)ensemencées avec les souches résistantes au antibiotiques dans les mêmes conditions précédentes, les boites sont pré-incubées pendant 2h à 4°C, puis incubées à 37°C /24h.

c) Méthode des disques :

Des Disques en papier vierge stérile sont déposés sur des géloses MHensemencées dans les mêmes conditions précédentes. Ensuite, 25µl des fractions suscitées sont mis sur les disques en papier, les boites sont pré-incubées pendant 2h à 4°C, puis incubée à 37°C/24h.

IX. Test de synergie bactériocine-imipenème :

D'après Bendjeddou et *al.* 2012, la bactériocine produite par *Lb. paracasei* se trouve dans la fraction obtenue avec à 30% d'acétonitrile, or l'activité antibactérienne des autres fractions (0% à 20%) est attribuée à d'autres composés non déterminés dont le plus important pourrait être l'acide lactique (Bendjeddou et *al.*, 2012). De ce fait, Le test de synergie entre la bactériocine produite par la souche de lactobacilles et l'imipinème, à l'égard des souches résistantes aux antibiotiques, n'est réalisé qu'avec la fraction 30% et le surnagent concentrés utilisé comme témoin. Ce Test est effectué par 2 techniques :

1-Test de synergie Sur milieu solide

Le test de synergie est réalisé à l'égard de toutes les souches résistantes à l'imipeneme, chaque souche estensemencée sur une gélose Mueller Hinton dans les mêmes conditions citées précédemment.

➤ Méthode 1:

Un disque d'imipenème contenant 10µg d'antibiotique et un disque en papier vierge stérile sont déposé sur la gélose à une distance de 1 mm l'un de l'autre. Sur le disque en papier, 25 µl de surnagent concentré sont déposés et laissé sécher 10 min à température ambiante. Des distances de 0.5 mm et 1.5 mm sont également utilisées. Un disque d'imipenème seul et un disque vierge imbibé de surnagent concentré (25µl) sont utilisés comme témoin. La boite est, ensuite incubée à 37° C pendant 24h. La synergie est révélée par l'apparition d'une image de synergie entre le disque d'imipenème et celui du surnagent concentré.

➤ Méthode 2

Un disque d'imipenème (10µg) est déposé sur la gélose, sur ce disque, 25 µl de surnagent concentré sont déposés et laissé sécher 10 min à température ambiante. Un disque

vierge imbibé par 25µl de surnagent brute un disque imipenème seul sont utilisé comme témoin sur la même boîte de Pétri. La boîte est, ensuite incubée à 37° C pendant 24h.

La synergie entre l'imipenème et les substances antibactériennes produites par *Lb. paracasei* est révélée par une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque d'imipenème additionné du surnagent concentré comparée à celles obtenues avec les disques des substances antibactériennes et d'imipenème et seuls.

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

Pour réaliser ce test, des microplaques de 96 puits sont utilisés. Ces microplaques sont composées de 12 lignes contenant 8puits chacune. Pour chaque souche étudiée, 5 lignes de 8 puits sont utilisées. Dans le premier puits de chaque ligne, 100 µl des solutions à tester sont déposés comme suit (fig.) :

- Une ligne: Imipenème (1^{er} puits : 32 µg/ml)
- Une ligne: Surnagent concentré (1^{er} puits : 64 UA/ml)
- Une ligne: Imipenème+ Surnagent concentré (1^{er} puits : 64µg/ml d'imipenème + 64 UA/ml de surnagent concentré)
- Une ligne: Fraction 30% (1^{er} puits : 64 UA/ml)
- Une ligne : Imipenème+ Fraction 30% (1^{er} puits : 32µg/ml d'imipenème + 64 UA/ml de la fraction 30%)

A partir du premier puits de chaque ligne, des dilutions en cascade à ½ sont effectuée (en utilisant le bouillon Mueller Hinton) jusqu'au dernier puits. Ensuite, 100µl 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 révéler 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 antibactérien séparés .

I. Recueil des souches bactériennes

Au total, 40 souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux antibiotiques ont été collectées au niveau du CHU de Batna et des laboratoires d'analyses médicales Moualek et Djama de Bejaia durant la période allant Décembre 2013 à Mars 2014. Les informations correspondant à ces souches sont données dans annexes 2.

II. Détermination de la CMI :

Nous avons testé les CMI des 40 souches vis-à-vis de l'imipenème. Les valeurs des CMI varient entre 8µg/ml et 32µg/ml ou plus (annexe 2). Nous notons que les CMI>32 µg/ml sont les plus retrouvées avec 10/40 des souches isolées. Un exemple de résultat est montré dans figure 2.



Figure 2: Résultat de CMI pour les souches : *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*

III. Analyse de phénotypes de résistance :

III 1-Recherche de la production de carbapénémases :

L'image de trèfle était bien visible sur (44,44%) 8/18 souches retrouvées résistantes ou intermédiaire à l'IMI, ce qui indique que ces dernières produisent probablement une carbapénémase. Un exemple de cette image de trèfle est montré dans la figure 3 pour la souche *Acinetobacter baumannii* 19.

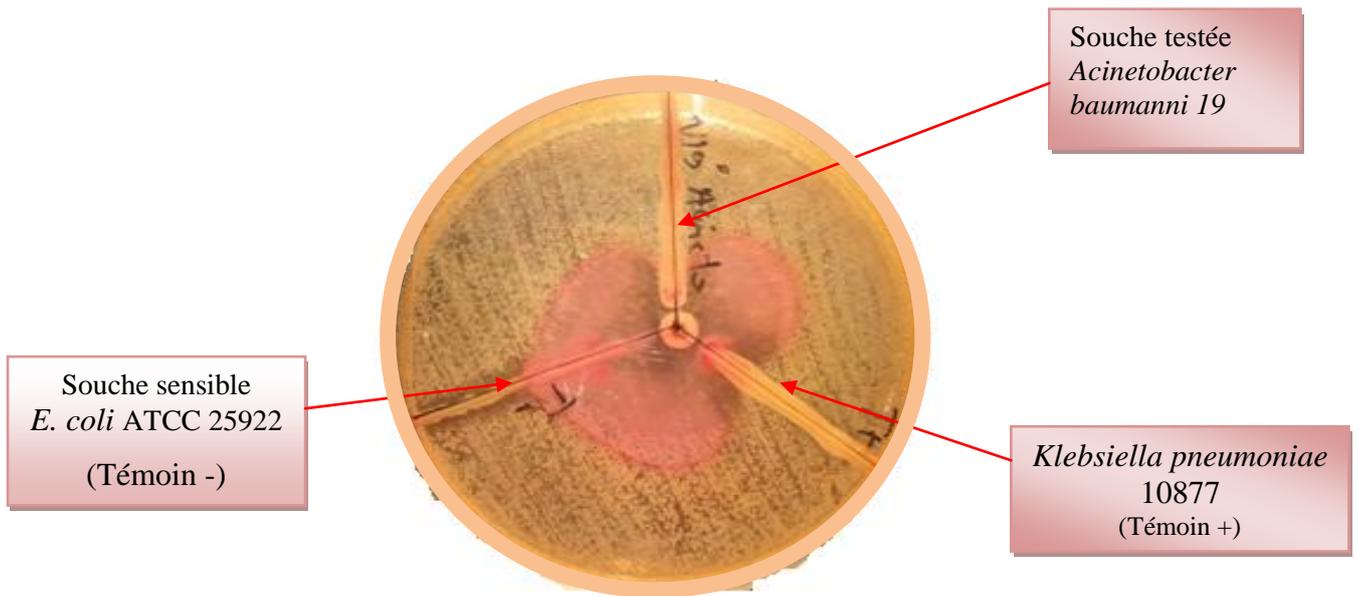


Figure 3 : Hodge test positive pour la souche *Acinetobacter baumannii* 19

III .2-Recherche de métallo- β -lactamases

➤ EDTA :

Le test à l'EDTA a montré une récupération pour l'IMP-EDTA pour 4 souches d'*Acinetobacter baumannii* et une souche de *pseudomonas aeruginosa* ce qui signifie que ces souches produisent probablement une carbapénémase de type métallo-bêta-lactamases (B).

La figure 4 montre le résultat du test de synergie (imipenème-EDTA) et le test des doubles disques.

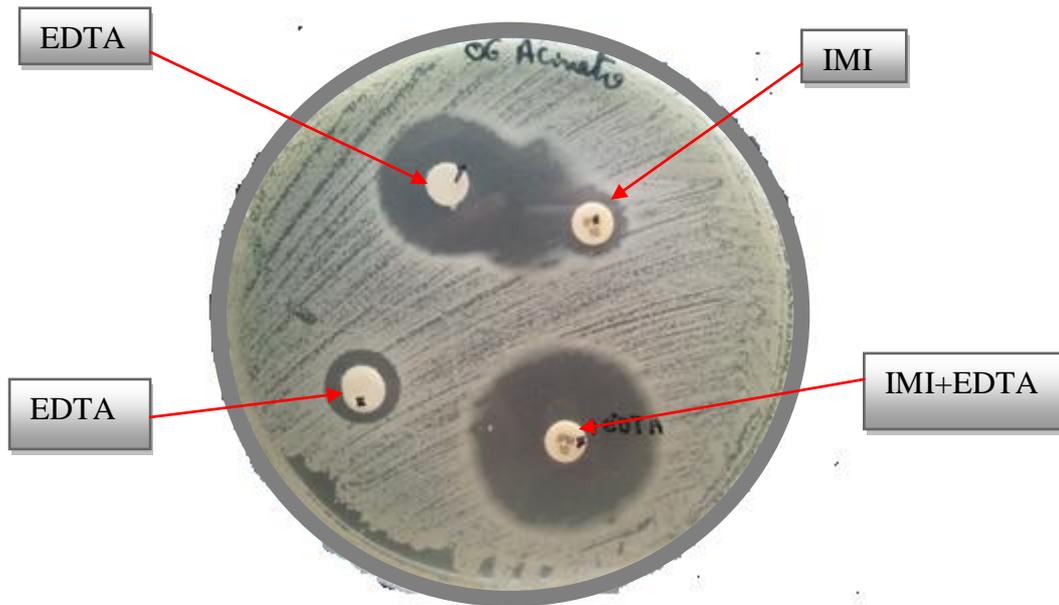


Figure 4 : Résultat du test synergie entre l'IMI et EDTA pour la souche *Acinetobacter baumannii* 06

III. 3 Recherche de la production de KPC

Le test à l'acide boronique a montré une récupération pour l'IMP-Acide boronique pour la souche *Acinetobacter baumannii* 13. Ce qui signifie que cette souche produit probablement une carbapénémases de classe A (KPC) (voir figure5).

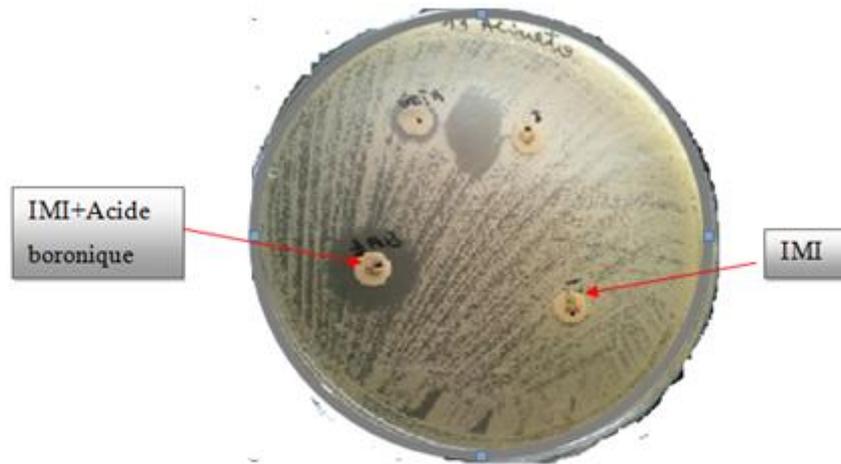


Figure N°5: Résultat de test à l'acide boronique avec la souche *Acinetobacter baumannii* 13

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

Le test d'activité du surnageant concentré a donné des zones d'inhibition d'un diamètre de 29 mm. Cependant, l'activité antibactérienne du surnageant non concentré des autres combinaisons était faible avec des zones d'inhibition d'un diamètre de 15mm. Récupéré après centrifugation et testé l'égard d'*E. coli*, a révélé une zone d'inhibition de 29mm de diamètre (fig. 7).

Ces résultats montrent que cette souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est douée d'un effet antibactérien contre *E. coli*.

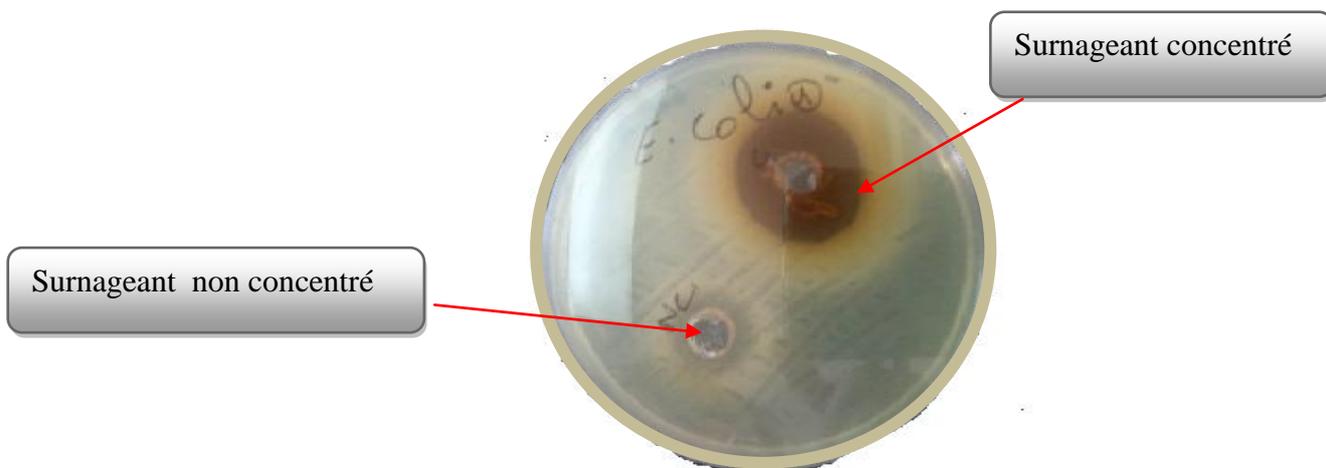


Figure 7 : Mise en évidence de l'effet antibactérien de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard d'*E. coli*

V. Extraction et purification partielle de la bactériocine produites par *Lb. paracasei* subsp. *Paracasei*

L'extraction et la semi-purification de la bactériocine produites par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* sont effectuées par dialyse et chromatographie en phase inverse respectivement. Après évaporation sous vide, des solvants organiques des fractions obtenues par chromatographie, le test d'activité antibactérienne de ces fraction à l'égard d'*E. coli* a montré que la fraction obtenues avec 30% d'acétonitrile présentent une bonne activité antibactérienne.

Les résultats du test d'activité, des fractions obtenus, à l'égard des souches résistantes aux antibiotiques ont montré que toutes les fractions testées (à l'exception du dialysat) ont présenté une activité antibactérienne à l'égard des 18 souches résistantes à l'imipénème: (toutes les souches d'*E. coli*, d'*Acinetobacter baumannii*, de *pseudomonas aeruginosa* et de *serratia mercenscens*). La comparaison des différentes techniques de test d'activité sur gélose a permis de déterminer la meilleure méthode permettant d'avoir un bon résultat avec le minimum de perte en substances antibactériennes, il s'agit de la méthode des disques (fig. 8),

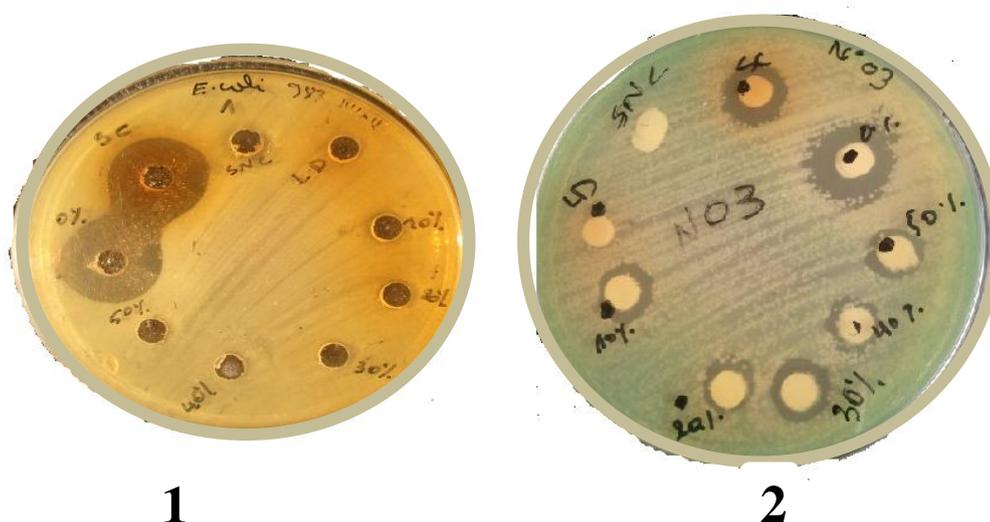




Figure 8: Test d'activité antibactérienne, des différentes fractions obtenus, à l'égard des souches résistantes à l'imipénème en utilisant des différentes méthodes : (1) méthode des puits (*E.coli*), (2) méthode des disques (*Pseudomonas aeruginosa*), (3) méthode des spots (*Acinetobacter baumannii*).

VI. Test de synergie entre la bactériocine et l'imipénème:

a) 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 visualiser des images de synergie chez 5 souches d'*Acinetobacter baumannii* et deux souches d'*E. coli*, l'image la plus clair est celle visualisé chez *Acinetobacter baumannii* 06 (fig 9). Aucune image de synergie n'est détectée chez les autres souches testées.



Figure 9: Images de synergie obtenue lors du test de synergie entre la bactériocine et imipénème chez les souches résistantes à l'imipénème.

b) Test de synergie sur milieu liquide «Technique des microplaques »

Par définition, le nombre d'unité arbitrale est égal à l'inverse de la plus forte dilution qui donne une zone d'inhibition (ou absence de croissance dans les microplaques). Ainsi, du fait que la souche la plus sensible aux substances antibactériennes produites par *Lb. paracasei* est inhibée à une dilution de 1/64, nous considérons que le premier puits de la microplaque (100 µl de surnageant concentré) contient 64 unité arbitraire (UA).

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

$$\text{FICI} = \frac{\text{CMI de l'antibiotique en présence de la bactériocine}}{\text{CMI de l'antibiotique seul}} + \frac{\text{CMI de la bactériocine en présence de l'antibiotique}}{\text{CMI de la bactériocine en}}$$

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

La synergie entre l'imipénème et la bactériocine est détectée chez 5 souches, il s'agit d'*Acinetobacter baumannii* 662, *Pseudomonas aeruginosa* 03, *Pseudomonas aeruginosa* 21, *E. coli* 036 et *E. coli* 164 (Fig. 10)

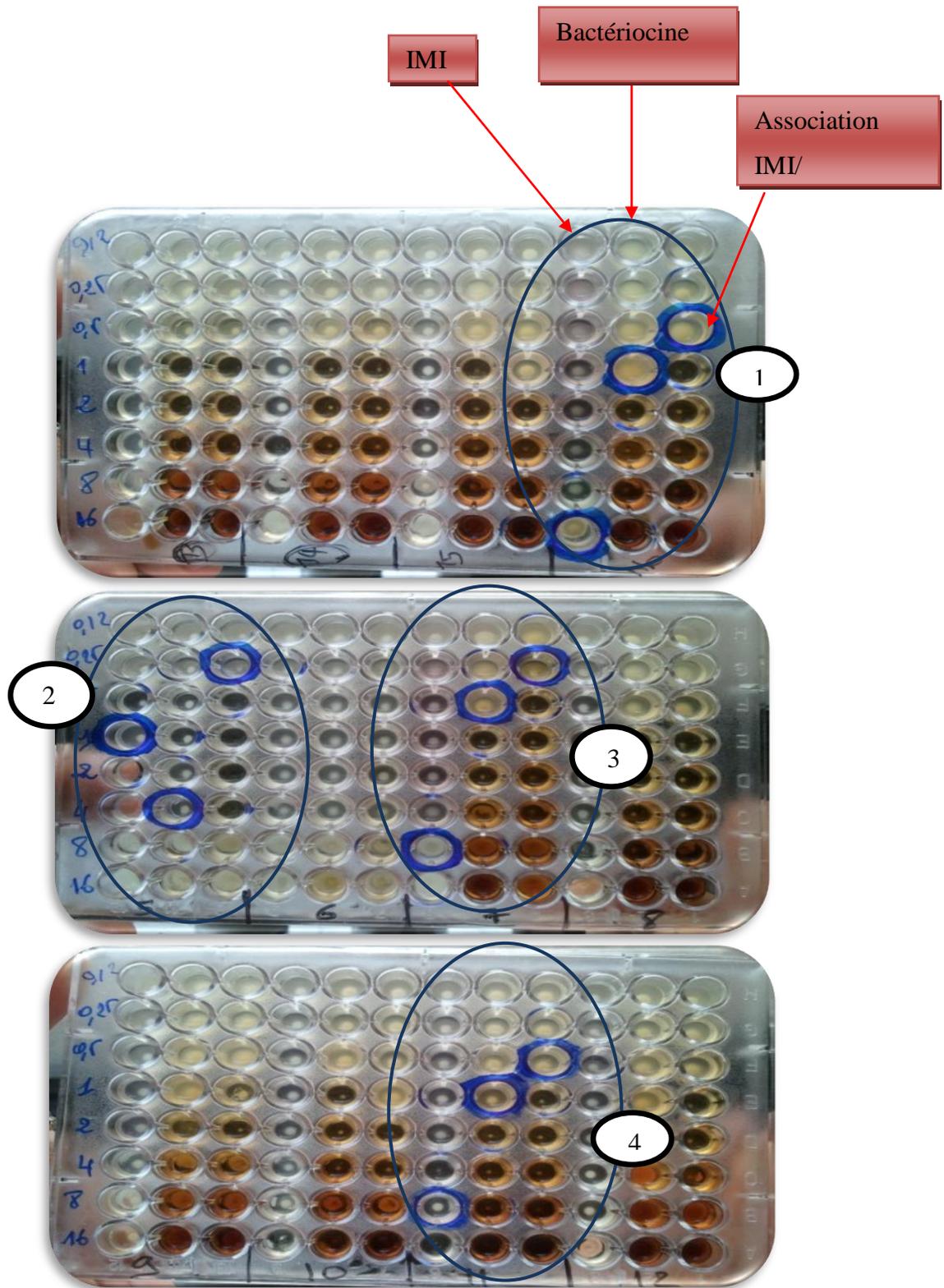


Figure 10: Test de synergie de l'imipénème et la bactériocine produite par *Lb.paracasei* envers des souches résistantes à l'imipénème : (1): *Pseudomonas aeruginosa* 03, (2): *E. coli* 12997, (3): *Pseudomonas aeruginosa* 21, (4) : *E.coli* 164.

D'après les résultats obtenus, la synergie entre l'imipénème et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* a permis de réduire les CMI de l'imipénème, cette réduction est différentes d'une souche à une autre. Le taux maximal de réduction est révélé chez *Pseudomonas aeruginosa* 21 où l'association de la bactériocine à l'imipénème a permis de réduire la CMI de ce dernier de 16 µg/ml (imipénème seul) à 1 µg/ml une fois associé à la bactériocine avec un facteur de réduction égal à 32. Cependant, le taux de réduction le plus faible est enregistré chez *Acinetobacter baumannii* 662 où la CMI de l'imipénème est passé de 4 µg/ml (imipénème seul) à 2 µg/ml (imipénème associé à la bactériocine) avec un facteur de réduction de 2 seulement (tableau II).

Tableau II. Les résultats de synergie sur les microplaques

La souche	CMI IMI (mg/ml)	CMI SA (UA)	CMI IMI + SA (mg/ml)	CMI SA + IMI(UA)	FICI	Facteur de réduction	Synergie
20 <i>Acinetobacter baumannii</i>	>16	2	1	2	1.03	0	Absence
662 <i>Acinetobacter baumannii</i>	4	8	2	2	0.75	2	présence
WD47 <i>E. Coli</i>	>16	2	1	2	1.03	0	Absence
983 <i>E. Coli</i>	>16	4	2	4	1.062	0	Absence
13 <i>Acinetobacter baumannii</i>	4	2	1	2	01.25	0	Absence
12997 <i>E.Coli</i>	2	16	0,5	1	0.31	4	Présence

Résultats

21 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	2	0,5	1	0.53	32	Présence
960 <i>E. Coli</i>	8	2	1	2	1.12	0	Absence
12serratia <i>mersecens</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
939 <i>E. Coli</i>	>16	4	2	4	1.06	0	Absence
1160 <i>E. Coli</i>	16	2	1	2	1.06	0	Absence
164 <i>E. Coli</i>	16	4	1	2	0.56	16	Présence
036 <i>E. Coli</i>	8	4	1	2	0.62	8	Présence
19 <i>Acinetobacter baumannii</i>	>16	2	1	2	1.03	0	Absence
06 <i>Acinetobacter baumannii</i>	16	2	1	2	1.06	0	Absence
190 <i>E. Coli</i>	16	2	1	2	1.06	0	Absence
03 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>16	4	1	2	0.53	16	Présence

Les espèces de bacilles à Gram négatif les plus impliqués en clinique, demeurent les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Nordmann, 2010). Les carbapénèmes sont des β -lactamines souvent utilisées en dernier recours dans le traitement des infections à bacilles à Gram négatif multirésistants. L'activité de ces carbapénèmes est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la membrane externe de la paroi des bacilles Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises, y compris les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les céphalosporinases (Grallet *al.*, 2010).

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème, ertapénème) est l'un des problèmes les plus importants posés par la résistance aux antibiotiques car il existe peu d'alternatives thérapeutiques possibles. Cette résistance aux carbapénèmes a été rapportée dans les années 1990. Elle était limitée géographiquement, essentiellement au Japon, et due à un type particulier de carbapénémases: les métallo- β -lactamases de type IMP (Walsh *et al.*, 2005). Puis, progressivement, l'impact clinique et la diversité des carbapénémases se sont accrus considérablement pour devenir significatifs au milieu des années 2000 (Pagès, 2004).

La résistance aux carbapénèmes des bacilles à Gram négatif s'explique par deux grands mécanismes : l'expression de carbapénémases, et l'association des déficits quantitatifs ou qualitatifs de porines qui permettent le passage transmembranaire de carbapénèmes (Pagès, 2004).

La résistance aux carbapénémases peut résulter de mécanismes combinés associant des β -lactamases ayant une très faible activité de carbapénémase et une diminution de perméabilité de la membrane externe, ou de la présence de véritables carbapénémases. Ces dernières peuvent être de type KPC, de type métallo-enzymes (VIM, IMP, etc.), ou encore de type oxacillinase, et les NDM (Nordmann, 2010).

La production d'enzymes à large spectre (céphalosporinase hyperproduite ou BLSE) associée à une imperméabilité par altération de porines est la cause la plus fréquente de résistance à l'imipénème chez les entérobactéries. Par exemple chez les entérobactéries la résistance aux carbapénèmes associant l'expression de céphalosporinases et une diminution de perméabilité, n'expriment pas naturellement de céphalosporinases chromosomiques comme *E. coli*, et mais qui expriment des céphalosporinases plasmidiques. Chez *P. aeruginosa*, la résistance aux carbapénèmes peut être le résultat de mécanismes assez différents qui sont éventuellement associés : imperméabilité de la membrane, surexpression de protéines d'efflux, expression de β -lactamases (Strateva T, Yordanov D 2009).

Les carbapénèmases chez *A. baumannii* ont maintenant été très bien décrites. Il s'agit rarement des β -lactamases inhibées par l'acide clavulanique (classe A de Ambler) ou de métallo- β -lactamases, mais le plus souvent d'oxacillinase aux propriétés de carbapénémase (Nordmann P, *et al.*, 2009 ; Poirel L, *et al.* 2010). De nombreuses études font état de l'augmentation progressive de la résistance aux carbapénèmes chez cette espèce bactérienne (Thomson JM *et al.*, 2005 ; Giamarellou H, *et al.*, 2009 ; Towner KJ, 2009). Le rôle de la porine CarO et celui d'une autre protéine de 43kDa (OprD-like) ont été démontrés dans la résistance à l'imipénème (Poirel L, *et al.*, 2009). En revanche, l'importance de la modification de ces porines dans la résistance phénotypique aux carbapénèmes reste à préciser. La prévalence de la résistance aux carbapénèmes croît dans le monde entier chez toutes les espèces de bacilles à Gram négatif cliniquement importantes (Nordmann, 2010).

Bien que le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus répandu chez *A. baumannii* corresponde à l'acquisition de carbapénèmases, ou à l'hyper-expression de l'OXA-51 chromosomique, des mécanismes de résistance non enzymatiques existent. Ainsi, le rôle de l'absence ou de la modification de porine dans la résistance aux carbapénèmes est fortement probable et semble liée à l'inactivation d'un gène codant pour une porine dénommée CarO (Poirel L, Nordmann P. 2006).

En Algérie, selon le réseau national de la surveillance des bactéries résistantes aux antibiotiques, la résistance aux carbapénèmes commence à disséminer dans les hôpitaux algériens, dont des carbapénèmases ont été isolées. Des métallo- β -lactamases comme VIM-19 ont été isolées à l'hôpital Ain Naaja à Alger en 2008 et 2009. L'enzyme VIM-4 a été caractérisée en 2010 à l'hôpital de Bouloghine (Benamrouche *et al.*, 2009). Ainsi en Algérie, la diffusion de l'OXA-23 chez les isolats d'*A. baumannii* a été signalée depuis 2010. La coproduction du gène *bla_{OXA-23}* avec d'autres gènes oxacillinases a été rapportée : *bla_{OXA-24}* (Mesli *et al.*, 2013), *bla_{OXA-72}* (Bakour *et al.*, 2012) et *bla_{OXA-58}* (Touati *et al.*, 2012). Cela suggère que l'épidémiologie probable de la résistance aux carbapénèmes par oxacillinases chez les souches d'*A. baumannii* a changé en Algérie, étant donné que le gène *bla_{OXA-23}*, codant les carbapénèmases, est le plus répandu dans notre pays.

Ces espèces multirésistantes aux antibiotiques sont souvent impliquées dans des infections nosocomiales et compliquent le traitement des patients (Thomson et Bonomo, 2005 ; Woodford et Livermore, 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 Bonomo, 2005). Par conséquent, il est clair que trouver un

autre moyen de traiter ou prévenir ces infections est d'une importance majeure pour la santé publique. Parmi les alternatives à proposer, c'est l'association de ces antibiotiques à d'autres composés antibactériens à fin de réduire leur CMI. L'étude des phénomènes de synergie contre les antibiotiques et les autres substances antibactériennes s'avère intéressante.

Les bactériocines sont des polypeptides antimicrobiens synthétisés par des ribosomes. 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. 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, la réplication de l'ADN, la transcription de l'ADN et la traduction de l'ARNm, mais la plupart d'entre elles agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique des cellules (Oscariz et Pisabarro, 2000 ; Twomey et al., 2002). La formation de pores membranaires a pour conséquence directe la dissipation de la force proton motrice ou encore l'efflux des petits métabolites tels que les acides aminés et l'ATP, les ions K⁺ et H⁺. La perte de ces composés intracellulaires vitaux entraîne des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance à la mort cellulaire (Twomey et al. 2002).

Les résultats de l'association de l'imipénème à une bactériocine produite par *Lb.pracasei* ont montré que cette association a provoqué une synergie entre ces deux composés antibactériens chez 9 souches sur 18 souches étudiées. Cette synergie a permis de réduire la CMI de l'imipénème à des facteurs allant de 2 à 32 fois. Une souche *E. coli*, la CMI a été réduite de 16 à 1 µg/ml (Facteur de 16), chez *Pseudomonas aeruginosa* elle a été réduite de 16 à 0,5 µg/ml (Facteur de 32) et chez *Acinetobacter baumannii* a été 4 à 0,5 µg/ml (facteur de 8).

Cette synergie observée en associant imipénème à la bactériocine peut être expliquée par plusieurs mécanismes :

- La formation de pores transmembranaires non spécifiques, par la bactériocine, chez une bactérie résistante à l'imipénème, par l'imperméabilisation de la membrane externe, entraîne le passage davantage de l'antibiotique travers les pores formés par la bactériocine, ce qui aboutit à la sensibilité de cette bactérie à l'imipénème. Cette souche devient aussi sensible à l'antibiotique car la formation de pores par la bactériocine a contrecarré les mécanismes de résistance aux antibiotiques par l'imperméabilisation.
- Les autres mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être contrecarrés, aussi par le phénomène de 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 formées par la bactériocine, ce qui entraîne la saturation de la pompe, sans oublier que les bactériocines provoquent aussi la sortie des protons et de l'ATP du cytoplasme ce qui entraîne davantage l'affaiblissement de la pompe à efflux dépendant de ces composés (ATP ou protons).

- Quant au mécanisme de résistance aux antibiotiques par production d'enzyme, ce mécanisme pourrait aussi être perturbé par la formation de pores provoquées par la bactériocine à cause du stress cellulaire que subit la bactérie suite à la formation de ces pores (la cellule consomme plus d'énergie pour récupérer les molécules échappé 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'antibiotique à une vitesse suffisante pour procurer une résistance à l'antibiotique.

Dans la présente étude, 40 souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux antibiotiques ont été collectées au niveau de l'hôpital de Batna ainsi qu'à deux laboratoires d'analyses à Bejaia.

Parmi les souches collectés, 45% sont résistantes à l'imipénème avec des CMI allant de 2 µg/ml à plus 32 µg/ml. Parmi ces souches, 11 appartiennent à *E. coli*, 4 à *Acinetobacter baumannii*, 2 à *Pseudomonas aeruginosa* et 1 à *Serratia mercisensis*.

L'analyse phénotypique de la résistance aux carbapénèmes (imipénème) a montré que 11 souches sont résistantes aux carbapénèmes par un système non enzymatique et 8 par production de carbapénémases (5 de type MBL, et 1 de type KPC et MBL en même temps).

L'association de l'imipénème à une bactériocine produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* a révélé des effets synergiques contre les 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 différentes d'une souche à une autre. Chez *Pseudomonas aeruginosa* 21, l'association de la bactériocine à l'imipénème a permis de réduire la CMI de ce dernier de 16 µg/ml à 1 µg/ml avec un facteur de réduction égal à 32. Cependant, un taux de réduction le plus faible est enregistré chez *Acinetobacter baumannii* 662 où la CMI de l'imipénème est passé de 4 µg/ml à 2 µg/ml avec un facteur de réduction de 2 seulement.

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaire, ils doivent être complétés par une série d'autre tests à savoir:

- Des techniques de biologie moléculaire pour confirmer les phénotypes de résistance des souches.
- Etude des supports génétiques (plasmidique ou chromosomique) responsables d'une éventuelle dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif
- Suivit, dans le temps, de l'évolution des mécanismes de résistances.
- Des tests de synergie en utilisant la bactériocine pure pour confirmer les résultats obtenus.

ANNEXE II

Tableau N° I : Différents tests biochimiques d'identification (Denis *et al.* 2007)

Milieu de Culture	Test	Mode d'ensemencement	Lecture	Interprétation
Bouillon Nitraté	Recherche de la nitrate-réductase	Ensemencement de bouillon nitraté et incubation à 37°C/24h	Couleur rouge après l'ajout des réactifs NRI et NRII	Nitrate réductase Positive
Milieu TSI	Fermentation des sucres et production de gaz et d'H ₂ S	Ensemencement de la pente par stries puis le culot par piqûre centrale. Incubation à 37°C/24h	Virage de la pente au Jaune	Fermentation du lactose +
			Virage du culot au Jaune	Fermentation du glucose +
			Apparition de bulles de gaz	Production du Gaz
			Noircissement du Milieu	Production d' H ₂ S
Bouillon Clark et Lubs	Etude du type fermentaire (d'acétain ou acide mixtes)	Ensemencement du milieu Clark et Lubs et incubation à 37°C/ 48h	Couleur rouge après ajout des réactifs VPI et VPII	Formation d'acétoine VP+
			Coloration rouge après ajout du réactif RM	Formation des acides mixtes RM+

Milieu Mannitol et Mobilité	Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité	Ensemencement du milieu par piqûre centrale. Incubation à 37°C/24h	Coloration jaune du Milieu	Fermentation du mannitol
			Croissance homogène dans toute la gélose (formation d'un voile)	Mobilité
Milieu Urée Indole	Recherche d'uréase et de TDA et la production d'indole	Ensemencement du milieu urée indole et Incubation à 37°C/24h	Virage du milieu en Rose	Présence d'une Uréase
			Anneau rouge en surface après ajout du réactif de Kovacs	Production d'indole
			Formation d'un précipité marron	Présence de TDA
Milieu Citrate de Simmons	Utilisation du citrate comme seule source de carbone	Ensemencement par stries à partir d'une culture sur milieu solide. Incubation à 37°C pendant 1 à 7 jours	Croissance sur la pente et virage du milieu au bleu (alcalinisation du milieu)	Utilisation du Citrate

TableauII: Résultats des tests d'identification de bacilles à Gram négatif les plus représentatifs :

Code	URE	IND	GLU	LAC	GAZ	H2S	CIT	MAN	MOB	VP	RM	Espèce
D47w	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E Coli
12	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>S. marcescens</i>
W12997	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
WH954	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
M1622	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
960	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
162	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
164	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
192	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
190	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
160	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
W14932	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
21	-	-		-		-	+	-	+	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
03	-	-		-		-	+	-	+	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
D.586	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
D.036	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
D.346	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
13890	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
13962	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
14206	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
13982	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
13886	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
983	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
939	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
925	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
379	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
12903	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli

1486	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
13359	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	E coli
W13036	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Klebsiella p.</i>
13825	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Klebsiella P</i>
W166	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Klebsiella P</i>
13273	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	Enterobactersp
14148	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	Enterobactersp
13260	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	Citrobactersp

Tableau III: Caractérisations des souches recueillies

Lieu de collection	Date	Code	Espèce	Age	Sexe	Prélèvement
CHU Batna	23.12.2013	03	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16ans	H	LCR
CHU Batna	24.12.2013	06	<i>Acinetobactersp</i>	27 ans	F	ECBU
CHU Batna	24.12.2013	12	<i>Sarratiamerscens</i>	32ans	F	ECBU
CHU Batna	29.12.2013	13	<i>Acinetobactersp</i>	19ans	H	PUS
CHU Batna	16.01.2014	19	<i>Acinetobactersp</i>	2ans	F	ECBU
L.M	11.02.2014	D47	<i>E.coli</i>	30ans	H	PV
L.M	11.02.2014	W12997	<i>E.coli</i>	32ans	F	ECBU
L.M	12.02.2014	13260	<i>Citrobactersp</i>	62ans	H	ECBU
L.M	12.02.2014	13273	<i>Enterobactersp</i>	26ans	F	ECBU
L.M	12.02.2014	13359	<i>E.coli</i>	22ans	F	ECBU
L.M	11.02.2014	W13036	<i>Klebseilla.pneumoniae</i>	32ans	F	ECBU
L.D	14.02.2014	D586	<i>E.coli</i>	65ans	H	ECBU
L.D	15.02.2014	D036	<i>E.coli</i>	27ans	F	PV
L.D	15.02.2014	D346	<i>E.coli</i>	32ans	H	ECBU
L.M	16.02.2014	13890	<i>E.coli</i>	26ans	F	ECBU
L.M	16.02.2014	13825	<i>K. pneumoniae</i>	65ans	F	ECBU
L.M	16.02.2014	13962	<i>E.coli</i>	63ans	F	ECBU
L.M	16.02.2014	13982	<i>E.coli</i>	33ans	F	PV
L.M	17.02.2014	14206	<i>E.coli</i>	18ans	H	ECBU
L.M	17.02.2014	14148	<i>Enterobactersp</i>	78ans	H	ECBU
L.M	17.02.2014	13886	<i>E.coli</i>	6ans	F	ECBU
L.D	18.02.2014	983	<i>E.coli</i>	24ans	H	ECBU
L.D	18.02.2014	939	<i>E.coli</i>	33ans	H	ECBU
L.D	18.02.2014	925	<i>E.coli</i>	65ans	F	PV

L.D	19.02.2014	379	<i>E.coli</i>	26ans	H	ECBU
L.D	19.02.2014	W12903	<i>E.coli</i>	18ans	H	ECBU
L.M	19.02.2014	1486	<i>E.coli</i>	70ans	H	ECBU
L.M	19.02.2014	903	<i>K.pneumoniae</i>	47ans	H	ECBU
L.M	22.02.2014	W14932	<i>E.coli</i>	39ans	F	ECBU
L.M	23.02.2014	WH954	<i>E.coli</i>	8ans	F	ECBU
L.M	24.02.2014	M1622	<i>E.coli</i>	39ans	F	PV
L.D	24.02.2014	960	<i>E.coli</i>	40ans	H	ECBU
L.D	25.02.2014	162	<i>E.coli</i>	33ans	H	ECBU
L.D	26.02.2014	164	<i>E.coli</i>	70ans	F	PV
L.D	26.02.2014	192	<i>E.coli</i>	22ans	F	PV
L.D	26.02.2014	190	<i>E.coli</i>	18ans	F	PV
L.M	26.02.2014	W166	<i>K.pneumoniae</i>	27ans	H	ECBU
L.M	27.02.2014	1160	<i>E.coli</i>	70ans	F	ECBU
CHU Batna	3.03.2014	20	<i>Acinetobactersp</i>	42ans	F	LCR
CHU Batna	3.03.2014	21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49ans	H	ECBU

Tableau IV: Résultats de CMI

Code	Souche	CMI µg/ml
12	<i>Sarratiamecenece</i>	>32
21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 32
WD47	<i>E.coli</i>	16
W12997	<i>E.coli</i>	> 32
D036	<i>E.coli</i>	32>
983	<i>E.coli</i>	32>
939	<i>E.coli</i>	8
960	<i>E.coli</i>	8
164	<i>E.coli</i>	8
190	<i>E.coli</i>	8
1160	<i>E.coli</i>	8
W14932	<i>E.coli</i>	16
03	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32>
06	<i>Acinetobactersp</i>	>32
13	<i>Acinetobactersp</i>	>32
20	<i>Acinetobactersp</i>	> 32
19	<i>Acinetobactersp</i>	>32
D586	<i>E.coli</i>	8

Tableau V : Diamètres des zones d'inhibition édités par le CFA-SFM, 2012

Antibiotique	abréviation	La charge (µg)	Ø critique (mm)		Concentration critique µg/ml	
			S	R	S	R
imipenèmes	IMI	10ug	≥ 24	< 17	≤ 2	> 8

ANNEXE I

Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée, en g/L)

(Guiraud, 2003) :

Bouillon nutritif :

Peptone.....10g
 Chlorure de sodium.....5g

Extrait de viande.....	5g
PH : 7,2	

Gélose Mac Conkey :

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de viande.....	03g
Lactose.....	10g
Mélange de sels biliaires.....	1,5g
Chlorure de sodium.....	05g
Rouge neutre.....	0,03g
Cristal viole.....	0,001g
pH : 7,4	

Gélose Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf.....	3g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar0.....	17g
pH : 7,4	

Gélose TSI (Tree Sugar and Ion):

Extrait de viande de bœuf.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Peptone tryptique.....	20g
Chlorure de sodium.....	5g
Citrate ferrique.....	0.3g
Thiosulfate de sodium.....	0,3g
Lactose.....	10g
Glucose.....	1g
Saccharose.....	10g
Rouge de phénol.....	0,05g
Agar.....	12g

PH : 7.4

Mannitol- Mobilité :

Peptone	20g
Nitrate de potassium.....	1g
Mannitol	2g
Rouge de phénol.....	0,04g
pH : 8,1	

Milieu de Citrate de Simmons :

Citrate de sodium.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Phosphate monoammoniaque.....	1g
Phosphate bipotassique.....	1g
Bleu de bromothymol.....	0,08g
Agar.....	15g
pH : 7.0- 7.2	

Bouillon nitraté :

Bouillon nutritif.....	1L
Nitrate de potassium.....	1g

Eau peptonée :

Peptone exempte d'indole.....	15g
Chlorure de sodium.....	5g
pH : 7,2	

Milieu Urée-Indole :

L-tryptophane.....	3g
Phosphate monopotassique.....	1g

Phosphate bipotassique.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Urée.....	20g
Alcool à 95°.....	10ml
Rouge de phénol.....	0,025g
pH : 7	

Milieu Clark-Lubs :

Peptone tryptique de viande.....	5g
Phosphate bipotassique.....	5g
Glucose.....	6g
pH : 7	

Gélose nutritive :

Extrait de viande.....	5g
Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	20g
pH: 7	

Composition des réactifs utilisés :

Réactif de Griess (NRI et NRII) :

NRI :

Acide sulfanilique.....	0,8ml
-------------------------	-------

Acide acétique 5N.....100ml

NRII :

Diméthylamine.....0,6ml

Acide acétique 5N.....100ml

Réactif de Kovacs :

p-diméthylaminebenzaldéhyde.....10ml

acidechloridrique.....50ml

Alcool amylique.....150ml

Réactifs de Voges-Proskauer (VPI-VPII) :

VPI :

α – naphтол.....0,5 g

Alcool à 90°100 ml

VPII:

NaOH 4N

Rouge de méthyle (RM) :

Rouge de méthyle.....0,5 g

Alcool éthylique à 60%100 ml

A

- **Andremont A, Brun-Buisson C, Coignard B, Djossou F, Dupon M, Fournier S, Grandbastien B, Lepelletier D, Lugagne N, Nordmann P, Rabaud C, Rahib D (2010).** Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques importées en France Par des patients rapatriés ou ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger. Collection : *Avis et Rapports*.

B

- **Bakour S, Kempf M, Touati A, Ameer AA, Haouchine D, Sahli F et Rolain JM.(2012).** Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol.* 61, 1341-1343.
- **Benamrouche N, Hadjila I et Rahal K. (2009).** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en Algérie. 11^{ème} rapport d'évaluation. p 198.
- **Boutet-dubois A, Pantel A, Sotto A, Lavigne J.(2012).** Synthèse : Les entérobactéries productrices carbapénémases. n°2.

C

- **Carle S. (2009).** La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important! Le parrainage des antimicrobiens : vision 2010. *Pharmactuel Vol. 42 Supplement 2*.
- **Comite De L'antibiogramme De La Societe Francaise 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).
- **Comite De L'antibiogramme De La Societe Francaise De Microbiologie:** Recommandations 2013.

- **Cotter,P.D.,C.Hill, et R.P.Ross.(2005).** « Bacteriocins : Developing innate immunity for Food »,Nat Rev Microbiol, vol.3,n°10,2005, p. 777-788.

D

- **Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E et Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed. Masson. 344-345.

G

- **Giamarellou H, Poulakou G.(2009).** Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs* ; 69: 1879-901.
- **Grall N, A.Andremont , L.Armand-Lefèvre .(2011) ,** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ?. *Journal des Antinfectieux*,p 16.

H

- **HAMMAMI, R., A. ZOUHIR, J. BEN HAMIDA, et I. FLISS.(2007).** « BACTIBASE: A Web-accessible Database for Bacteriocin Characterization », *BMC Microbiology*, vol. 7, n° 89,p. 7.
- **HASSAN, M., M. KJOS, I.F. NES, D.B. DIEP, et F. LOTFIPOUR. (2012).**« Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance», *J Appl Microbiol*, vol. 113, p. 723-736

J

- **Jeong SH, Bae IK , Park KO, An YJ, Sohn SG , Jang SJ , Sung KH , Yang KS , Lee K, Young D et Lee SH. (2006).** Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea. *J Microbiol.* 44 (4):423-431

L

- **Lee K, Kim CK, Yong D, Jeong SH, Yum JH, Seo YH, Docquier JD et Chong Y. (2010).** Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemases producing Gram-negative bacilli. *J Microbiol Meth.* 83, 149–152.

M

- **Martinez-Martinez L. (2008).** Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* ; 14 (Suppl 1) : 82-9
- **Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P.(2007).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* ; 13 : 560-78
- **Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. (2013).** Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-b-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *IJID.* p5.

N

- **Naghmouchi K, Baah J, Hober D, Jouy, Rubrecht C, Sané F, Dridere D.(2013).** Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential To Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol .57, N°6, p. 2719–2725.
- **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.
- **Nordmann P, Naas T, Poirel L.(2011).** Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 10

- **Pagès JM. (2004).** Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Med Sci (Paris)* ; 20 : 346-51.
- **Poirel L et Nordmann P. (2006).** Résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. Edition Msson, Paris. p100 -107

R

- **REDDY, K.V., C. ARANHA, S.M. GUPTA, et R.D. YEDERY. (2004).** « Evaluation of Antimicrobial Peptide Nisin as a Safe Vaginal Contraceptive Agent in Rabbits: In Vitro and in Vivo Studies », *Reproduction*, vol. 128, p. 117-126.

S

- **Strateva T, Yordanov D.(2009).** *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance.
J Med Microbiol ; 58 : 1133-48.
- **SOULSBY, L. (2007).** « Antimicrobials and Animal Health: A Fascinating Nexus », *J Antimicrob Chemother*, vol. 60, suppl. 1, p. i77-78.

T

- **Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M et Djahoudi A. (2012).** Emergence of bla OXA-23 and blaOXA-58carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Ag.* 40, 84-93
- **Thomson JM, Bonomo RA.(2005).** The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol*; 8:518-24.

Références bibliographiques

- **Towner KJ. (2009).** *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* 2009 ; 73 : 355-63.

W

- **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. (2005).** Metallo-B-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* ; 18 : 306-25.

Y

- **Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM et Chong Y. (2002).** Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 40, 3798–3801.

Introduction

*Matériel et
méthodes*

*Résultats et
discussion*

Conclusion

Résumé

Notre étude a pour objectif d'évaluation l'activité de l'imipénème seul et en association avec la bactériocine produite par *Lb paracasei* subsp *paracasei* contre les bacilles Gram négatif multi résistantes.

Au total 40 souche bacilles Gram négatif ont été collectés au niveau du CHU de Batna et les laboratoires d'analyse médicale Moualk et Djamma de Béjaia. La sensibilité de ces souches aux carbapénème a été réalisée par la détermination des CMI. Les phénotypes de résistance aux carbapénème ont été déterminés par le teste de Hodge, test EDTA. Test a acide bouonique.

L'association de l'imipénème à la bactériocine ont montré que cette association est provoqué une synergie entre ces composé antibactérienne 9 souche sur 18 souches étudiées, qui implique la réduction de la CMI a des facteurs allant de 2 à 32.

L'émergence des souches de bacilles à Gram négatif multirésistantes représente un sérieux problème thérapeutique, d'où la nécessité de l'application rigoureuse des règles d'hygiène et l'usage rationnel des antibiotiques et découvrir des nouvelles antimicrobiens et de développer des stratégies innovatrices pour réduire cette résistances.

Mots clés : Bacille a Gram négatif, Imipénème, CMI, Bactériocine, synergie.

.Summary

Our study aims at evaluating the activity of imipenem alone and in combination with the bacteriocin produced by *Lb paracasei* subsp *paracasei* against the multi-resistant Gram-negative bacilli.

In total 40 Gram negative strain were collected at the University Hospital of Batna and medical analysis and Moualk Djamma Bejaia laboratories. The susceptibility of these strains to carbapenem was performed by determination of MICs. The carbapenem-resistant phenotypes were determined by the Hodge test, EDTA test. Bouonique acid test.

The combination of imipenem bacteriocin showed that this association is caused synergy between the antibacterial compound 9 strain of 18 strains studied, which involves reducing the IJC factors ranging from 2 to 32.

The emergence of strains of multidrug-resistant Gram-negative bacilli is a serious therapeutic problem, which requires the rigorous application of the rules of hygiene and rational use of antibiotics and discovering new antimicrobials and develop innovative strategies to reduce this resistance.

Keyword : Bacillus Gram-négative, Imipenem, MIC, Bacteriocin, synergy.