

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

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



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

## **MASTER**

### *Thème*

**Etude de l'effet synergique d'une  
bactériocine et d'un antibiotique à  
l'égard de bactéries multirésistantes  
aux antibiotiques**

Présenté par :

**IBELHOULEN Hanane & ISSAOUN Mouna**

Soutenu le : 13 Juin 2016

Devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> GHAROUT A.

MCB

Président

M<sup>r</sup> BENDJEDDOU K.

MCB

Encadreur

M<sup>elle</sup> YANAT B.

MAA

Examineur

**Année universitaire : 2015 / 2016**

# *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.

On tient à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promoteur, le Dr BENDJEDDOU K. pour son aide précieuse et pour le temps qu'il nous a consacré.

Merci pour Mme GHAROUT A. d'avoir accepté de présider le jury qui a évalué ce travail, d'autre part, nous tenons également à remercier Melle YANAT B. d'avoir accepté d'être membre de jury.

Merci pour le chef de département le professeur TOUATI A. pour son soutien.

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

Nos remerciements particuliers et sincères vont pour Mr Djoudi F, Dr Boutaleb

Et l'ingénieur de laboratoire Mme RAHMANI D. pour son soutien moral et matériel.

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

# *Dédicaces*

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi

« Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni effort. Vous m'avez donné un magnifique model de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fière ».

Mes grand parents que Dieu les gardes pour toujours.

Mes chers frères : Nacer-Eddine et Seif-Eddine.

Mes sœurs : Samira, Siham, Fatima et leurs maris.

Mes tentes : Yamina, Ourida, Nadia et Berkahoum.

Mes nièces : Salsabil, Chaima et Imane.

Mes neveux : Amine, Islam, Houssam et Omar.

Toi mon binôme et toute ta famille.

Enfin, tout mes amies que j'aime tant : Amel, Souad, Nadia, Fatima, Soussou, Nadjet, Siham, Sabrina et Lynda.

***Mouna***

# *Dédicaces*

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi

« Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni effort. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fière ».

La mémoire de mon grand père IDIR.

Mes grands parents que Dieu les garde pour toujours.

Mes chers frères : Nourreddin et Lahlou.

Mes sœurs : Lydia, Djahida, Sabrina et leurs maris.

Ma nièce Eline.

Mes oncles, tantes et leurs familles.

Toi mon binôme et toute ta famille.

Enfin, tout mes ami(e)s que j'aime tant, Zahia, Salma, Sabrina, Aaziza, Djamilia, Fatima, Souhila, Souad, Latifa, Linda, Siham, Hania, Dihia, Nassim, Samira, Rima, Amir.....

***Hanane***



## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Evaporateur rotatif .....	09
<b>Figure 2 :</b> Montage de chromatographie effectuée sur gel C <sub>18</sub> de type Discovery DSC-18.....	11
<b>Figure 3 :</b> Méthode de microdillution.....	14
<b>Figure 4 :</b> Mise en évidence de l'effet antibactérien de <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> à l'égard d' <i>E coli</i> 25922.....	14
<b>Figure 5 :</b> Test d'activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 par la méthode des disques.....	15
<b>Figure 6 :</b> Test d'activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard de <i>S. aureus</i> résistante à la méthicilline par la méthode des disques.....	16
<b>Figure 7 :</b> Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par <i>Lb. paracasei</i> chez les souches : SARM 433, SARM 594.....	17
<b>Figure 8 :</b> Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par <i>Lb. Paracasei</i> chez les souches : SARM 391, SARM 298.....	18
<b>Figure 9 :</b> Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par <i>Lb. Paracasei</i> chez la Souche SARM 118.....	19
<b>Figure 10 :</b> Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par <i>Lb. paracasei</i> chez les souches : SARM 9384, SARM 29213.....	20

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Caractéristiques des souches bactériennes utilisée comme souches cibles (selon Mr. Djoudi F) .....	07
<b>Tableau II :</b> Préparation d'un gradient croissant d'acétonitrile dans la solution TFA à 0,05%.....	10
<b>Tableau III :</b> Résultats de la synergie de la paracaseicine A (PA) associée à la céfoxitine (FOX).....	21

## Liste des abréviations

**°C** : Degré Celsius

**ACN** : Acétonitrile

**ATB** : Antibiotique

**BHI** : Bouillon Cœur Cervele

**BMR** : Bactérie Multi Résistantes

**CIP**: Cyprofloxacine

**CLR** : Claretromycine

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DA** : Clindamycine

**E** : Érythromycine

**FICI**: Facteur d'Indexe Concentration Inhibitrice

**FOX**: Céfoxitine

**INC**: Inconnu

**MH**: Mueller Hinton

**MRS**: Man Rogosa et Sharpe

**ND**: Non Déterminé

**PA** : paracaseicine A

**PLP** : Protéine liant Pénicilline

**Subsp** : Sous Espèce

**TE** : Tétracycline

**TFA**: Acide Trifluoroacétique

**UFC/ml**: Unité Format Colonies par Millilitre



# Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste Des Tableaux

Liste Des Figure

Liste Des Abréviations

## Introduction

Introduction.....01

## Matériel et Méthodes

I. Origine des souches utilisées.....07

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

III. Vérification de l'activité antibactérienne de *Lb. Paracasei* à l'égard d'*E. coli* ATCC 25922.....08

IV. Purification partielle de la bactériocine produite par *Lb. Paracasei*.....09

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

IV.I-1 Préparation de la colonne.....10

V. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la fraction obtenue vis-à-vis des souches de SARLM et *E. coli* ATCC 25922.....11

VI. Repiquage des souches de SARM.....11

VII. Test de synergie sur milieu liquide par Technique des microdilutions .....12

## **Résultats et Discussion**

I. Mise en évidence de l'effet antibactérien de <i>Lb. Paracasei</i> à l'égard d' <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	14
II. Purification partielle de la bactériocine produite par <i>Lb. paracasei</i> .....	14
II.1- Test d'activité antibactérienne de la bactériocine à l'égard d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 et SARM.....	15
III. Test de synergie sur milieu liquide entre la paracaseicine et la céfoxitine.....	16
Discussion.....	22
Conclusion .....	24

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

Depuis l'introduction de la pénicilline au cours des années quarante, un grand nombre d'agents antimicrobiens ont été développés et commercialisés à des fins thérapeutiques, réduisant ainsi la morbidité et la mortalité humaine importantes associées aux infections bactériennes observées avant «l'ère des antibiotiques». Pourtant, l'optimisme initial, fondé sur l'intime conviction que toute infection bactérienne pouvait être traitée avec ces composés, fut rapidement renversé quand les premiers rapports d'émergence de résistance aux antibiotiques virent le jour peu après leur introduction en clinique (**Boerlin et white, 2006 ; Harbottel et al., 2006**).

En réalité, ce phénomène était tout à fait prévisible, Alexander Fleming, en 1945, mettait déjà en garde la communauté scientifique du danger encouru lors d'un usage inapproprié, tel qu'un sous-dosage, des pénicillines et des conséquences d'un tel acte *in vitro* et *in vivo* (**Mnylaert et Mainil, 2012**).

En plus des bénéfices évidents pour la santé humaine, l'introduction et l'usage des antimicrobiens en médecine vétérinaire ont, sans nul doute, contribué à l'amélioration de la productivité et de la santé animale au cours de ces dernières décennies (**Piddock, 1996 ; Johnston, 1998**). Cependant, leur utilisation dans l'alimentation animale en tant que promoteur de croissance (usage interdit depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006 dans l'union européenne) ou pour la prévention et le traitement de différentes maladies infectieuses, a également contribué à une sélection de résistants vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques parmi les microorganismes pathogènes et commensaux rencontrés au niveau des différentes flores de l'organisme des individus traités (**Harbottel et al., 2006**).

Malgré l'abondance des phénotypes de résistance aux antibiotiques observés au sein des bactéries, seul un nombre limité de mécanismes (tout dépend de l'antibiotique) par lesquels ces résistances sont acquises ont été décrits. Ainsi, les gènes codant pour les déterminants des résistances aux antibiotiques sont localisés, soit sur le chromosome bactérien, soit sur des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides ou des transposons, pour être transmis verticalement et horizontalement (**Muylaert et Mainil, 2012**).

La facilité avec laquelle les populations bactériennes s'adaptent à un environnement hostile, associée à leur grande capacité d'échange de matériel génétique, souligne le caractère inévitable du phénomène biologique des résistances aux antibiotiques auquel nous faisons face et qui sera probablement un problème récurrent de santé publique pour les décennies à venir (**Harbottel et al., 2006**).

Environ 25.000 personnes décèdent chaque année, dans l'union européenne, suite à une infection à bactérie résistante (**codex alimentaire commissions, 2010**). En effet, comparativement aux pathologies, à bactéries sensibles aux antibiotiques, les infections causées par des germes résistants sont associées à une morbidité et une mortalité plus élevées (**Boerlin et White, 2006**). Les conséquences économiques n'en demeurent pas moins importantes, avec un allongement des coûts liés aux soins de santé, dans un contexte où les alternatives antibiotiques en cas de résistance aux molécules de première voire de deuxième intention, sont généralement toxiques, moins efficaces, plus coûteuses et nécessitent des traitements plus longs (**codex alimentaire commissions, 2010**).

La fréquence et l'ampleur des infections causées par les bactéries résistantes ont augmenté autant en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. On peut maintenant observer une résistance chez presque toutes les bactéries potentiellement pathogènes (**Conly et al., 2002**).

Les  $\beta$ -lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane. Plus précisément la formation des ponts interpeptidiques. Leur cible sont les PLPs (protéines de liaison à la pénicilline), qui assurent des réactions de transglycolysation et de transpeptidation lors de la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (**Pinho et al., 2000**).

L'action bactéricide de ces antibiotiques se manifeste par une dégradation du peptidoglycane soit par lyse bactérienne et libération de substances pariétales ou par un déséquilibre entre une synthèse du peptidoglycane ralentie et une destruction par les autolysines. Il en résulte une paroi fragilisée ne résistant pas à la pression osmotique (**Tankovic, 2000 ; Cavallo et al., 2004**).

*Staphylococcus aureus*, est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve fréquemment sur la peau et dans les narines des personnes. C'est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines. Il est doué d'une grande capacité d'acquérir et d'exprimer un large éventuel de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques. (Shore et al., 2008 ; Lowy, 1998).

Au moment de l'introduction de la pénicilline en usage clinique, *S. aureus* était sensible à son action. En 1950, la première souche résistante à cet antibiotique a été décrite. De nouvelles molécules semi-synthétiques anti-staphylococciques furent alors commercialisées, et deux ans après l'introduction de la méthicilline (pénicilline semi-synthétique) en 1959, les premières souches résistantes à la pénicilline M (méthicilline) ont été rapportés (Durand et al., 2006).

En fait, cette résistance est acquise par l'insertion dans le chromosome bactérien d'un élément génétique mobile appelé SCC $_{mec}$  (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) abritant le gène *mecA* (Hiramatsu et al., 2001 ; Katayama et al., 2000). Le produit majeur de ce gène est une enzyme nommée protéine de liaison à la pénicilline additionnelle (PLP2a ou PLP2'), caractérisée par une faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines, par opposition aux autres PLP (au nombre de 4) impliquées dans la biosynthèse de peptidoglycane. Le SCC $_{mec}$  véhicule aussi une paire de gènes appelés (Cassette Chromosomal recombinase genes A and B « *ccrAB* ou *ccrA* et *ccrB*») qui code pour des recombinaisons A et B, ces dernières sont capable de mobiliser cet élément génétique (Ito et al., 1999).

Au cours de ces dernières années les *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) sont devenus des agents pathogènes qui circulent dans la communauté (Vandensch et al., 2003 ; Zetola et al., 2005 ; Cheung et al., 2007 ; Kuehnert et al., 2006), Ils sont contrairement aux souches nosocomiales, plus sensibles à la plupart des antibiotiques, hormis les bêta-lactamines (O'Brien et al., 2005), mais, ils ont tendance à être plus virulent que les SARM hospitaliers (Boyle-Vara et Daum, 2007).

Dans cette cours effrénée pour la lutte contre les bactéries résistantes, l'introduction de nouvelles familles d'antibiotiques ainsi que la modification et l'amélioration des classes existantes, au cours des six décennies écoulées, n'a pas suffi (Muylaert et Mainil, 2012).

Actuellement, des mécanismes de résistance sont rapportés pour tous les antibiotiques disponibles pour un usage clinique. C'est pourquoi une gestion efficace des molécules disponibles, de même que la recherche et le développement de nouveaux composés, sont indispensables afin de préserver la santé humaine et animale, des maladies infectieuses de plus en plus agressives en terme de traitement requis (**Boerlin et White, 2006 ; Harttel et al., 2006**).

En 1925, A. Gratia a été le premier à découvrir les bactériocines lors d'une expérience concernant deux souches d'*Escherichia coli*. Il a observé qu'une des souches d'*E. coli* produisait une substance, une colicine, capable d'inhiber l'autre souche (**Chu et al., 2009**). En effet, certaines bactériocines sont actives contre les pathogènes alimentaires ou les bactéries responsable d'altération. Elles ont un spectre d'action très variable (**De Vuyst et al., 1994**). De plus, les bactériocines présentent une sécurité d'utilisation puisque elles sont produites par des souches non pathogènes, non toxiques et la majorité sont détruites par les enzymes digestives (protéases).

Les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide ou bactériostatique contre des espèces proches de la souche productrice (**Klaenhammer, 1988**). Elles sont synthétisées par voie ribosomique généralement par des bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire. Leur spectre d'action antimicrobien, généralement étroit, comprend des souches appartenant à la même espèce que la souche productrice. Cette dernière produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produit (**Jack et al., 1995**).

Des bactériocines ayant des séquences en acides aminées proches peuvent présenter des spectres d'action différents ce qui laisse supposer une grande spécificité d'action. (**Morency et al., 2001**).

De plus, les concentrations minimales inhibitrices varient considérablement d'une espèce bactérienne à l'autre et même entre souches appartenant à une même espèce (**Meghrouh et al., 1999 ; Ennahar et al., 2000a**).

Leur mode d'action est réalisée en deux étapes, La première est une étape d'adsorption de la bactériocine à des récepteurs spécifiques ou non, sur la surface de la cellule. La seconde étape est la formation de pores causés par un enchainement de réaction qui altère la perméabilité membranaire (**Sahl et al., 1998**).

Quelques études ont montré l'effet des bactériocines sur des levures telles que *Candida albicans*. La souche, *Lactobacillus pentosus* TV35b, isolée à partir de sécrétions vaginales d'une femme enceinte. Produit un peptide, la pentocine TV35b. ayant une activité inhibitrice contre des souches de *Candida albicans* (**Okkers et al., 1999**).

La bactériocine L23, produite par *Lactobacillus fermentum* L23, a été testée contre 15 souches de *Candida albicans*. Les résultats ont montré que 95% des souches étaient inhibées par les bactériocines L23 (**Pascual et al., 2008**).

En 2008, une étude *in vivo* portée chez des souris a montrée que la Mersacidine, produite par *bacillus sp* souche HIL Y85, était capable d'inhiber la croissance des SARM au niveau de l'épithélium nasal (**Kruszewska et al., 2004**).

Les conséquences collectives et individuelles de la résistance bactérienne sont graves, car elle représente une cause croissante d'échecs thérapeutique (**Lonks, 2004**). Les stratégies utilisées pour surmonter ce problème consistent en l'identification de nouveaux agents antimicrobiens ainsi que l'utilisation d'agents antimicrobiens en combinaison. Selon les résultats d'études antérieurs, les bactériocines représentent une alternative prometteuse

Pour le traitement de maladies infectieuses (**Wang et al., 2013; Long et al., 2006; Hammami et al., 2013**).

L'effet synergique de bactériocines et antibiotiques est peu étudié. Cependant, rare sont les travaux qui ont été réalisés. D'après **Neghmouchi 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 polymixine E, a un effet inhibiteur important sur *L. monocytogenes* et *E. coli* résistants à la polymixine E. ces mêmes auteurs ont rapporté que l'association de la pédiocine PA-1 à la polymixine E, a permis de diminuer la CMI de cet antibiotique de 0,12µg/ml à 0,03µg/ml chez *E. coli*.

Des effets synergiques vis-à-vis du pathogène *Enterococcus faecalis* ont été rapportés en combinant la nisine avec la pénicilline ou le chloramphénicol (Tong et al., 2014).

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 la céfoxitine et la paracaseicine A produite par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK 2005, sur la résistance aux  $\beta$ -lactamines de certaines souches de SARM.

**I. Origine des souches utilisée**

Une souche de *Lactobacillus paracasei* a été utilisée pour la production de la bactériocine connue sous le nom de la paracaseicine A. cette souche identifiée par séquençage d'ADN 16S et spectrométrie de masse MALDI TOF (Matrix-Associated Laser Description /Ionization Time of flight) , est conservée à -18°C dans un bouillon MRS à 20% de glycérol.

De plus, 07 souches bactériennes de *S. aureus* résistantes à la méthiciline (SARM) ont été utilisées, dont 05 sont fournis par Dr Djoudi F et les deux autres souches sont d'origine clinique, collectées au niveau du laboratoire du centre hospitalo-universitaire de Béjaia. Elles étaient utilisées comme souches cibles pour étudier la synergie entre la céfoxitine et la bactériocine (Tableau I).

**Tableau I :** Caractéristiques des souches bactériennes utilisées comme souches cibles.

N° de souche	type	Origine de prélèvement	Profil de résistance					CMI de FOX µg/ml
			FOX	OXA	DA	E	CLR	
118	SARM-CA	PUS	FOX	OXA	DA	E	CLR	32
433	SARM-CA	PUS	FOX	OXA	NF	NF	NF	16
298	SARM-HA	PUS	FOX	OXA	CIP	TE	NF	4
391	SARM-HA	ORIELLE	FOX	OXA	TE	NF	NF	8
9384	SARM-HA	INC	FOX	OXA	NF	NF	NF	–
29213	SARM-HA	INC	FOX	OXA	NF	NF	NF	–
594	SARM-HA	LIQUIDE GASTRIQUE	FOX	OXA	TE	NF	NF	8

FOK : Cefoxitine ; OXA : Oxacilline ; CLR : Claretromycine ; CIP : Cyprofloxacine ; DA : Clindamycine ; E : Erythromycine ; INC : Inconnu ; NF : Non Fait ; SARM-CA : SARM Communautaire; SARM-HA : Hospitalier.



### II. Revivification de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

La revivification est effectuée par 03 repiquages successifs sur bouillon MRS jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance bactérienne. L'incubation a été réalisée dans une étuve à 37°C pendant 24h.

### III. Vérification de l'activité antibactérienne de *Lb. paracasei* à l'égard d'*E. coli* ATCC 25922

D'après Bendjeddou et *al.*, (2012), la souche de *lactobacillus paracasei* utilisée dans cette étude est douée d'une activité anti-*Escherichia coli* ATCC 25922, cette activité est attribuée à une bactériocine appelée paracaseicine A.

La détermination de l'activité de la bactériocine a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose par la technique des puits. Ainsi un tube de 9 ml de bouillon MRS estensemencé par 1 ml d'une culture fraîche (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 20 min à 4°C. Le surnageant récupéré a subi une concentration sous vide en utilisant un évaporateur rotatif à 40°C (figure 1). Une boîte de Pétri contenant la gélose de Muller Hinton a étéensemencée en masse avec une culture de 18h d'*E. coli* ATCC 25922 environ 10<sup>6</sup> UFC/ml et laissée sécher 15 min à température ambiante, ensuite un puits de 6 mm de diamètre est creusé dans la gélose à l'aide d'un embou stérile et rempli avec 100 µl du surnageant concentré, la boîte a été laissée pendant 3h à 4°C pour permettre la diffusion totale du surnageant et arrêter la croissance du germe cible. Après une incubation de 24 h à 37°C, la boîte a été vérifiée pour la présence de zone d'inhibition autour du puits afin de démontrer l'activité antibactérienne de la souche de lactobacilles à l'égard d'*E. coli* ATCC 25922.



**Figure 1** : Evaporateur rotatif.

#### **IV. Purification partielle de la paracaseicine A**

À partir d'une culture fraîche de 24 h /37°C de *Lactobacillus paracasei*, 03 flacons de bouillon MRS (250 ml) ont étéensemencés, puis incubés à 37°C/24h. Après élimination des cellules bactériennes par centrifugation (12000g, 20 min à 4°C), le surnageant récupéré est 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 de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est basée sur l'emploi de chromatographie en phase inverse C<sub>18</sub> (sep-pack).

##### **IV.I- Chromatographie en phase inverse**

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

#### **IV. 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 120 ml 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 II).

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

<b>Volume d'acétonitrile</b>	<b>Volume de TFA à 0.05%(ml)</b>	<b>Volume final (ml)</b>	<b>Concentration de la solution en acétonitrile (%)</b>
12	108	120	10%
24	96	120	20%
36	84	120	30%
48	72	120	40%

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

Le surnagent 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 les solutions ayants le gradient discontinu d'acétonitrile. En fin, la colonne est lavée avec 120 ml d'acétonitrile (figure 2).

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



**Figure 2 :** Montage de la chromatographie effectuée sur gel C<sub>18</sub> de type Discovery DSC-18.

### **V. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la fraction obtenue vis-à-vis des souches de SARM et *E. coli* ATCC25922**

Les souches de SARM utilisées sont : SARM 9384 et SARM 29213 et *E. coli* ATCC25922. La mise en évidence de cette activité à l'égard de ces souches est déterminée par les méthodes de diffusion sur disques.

### **VI. Repiquage des souches de SARM**

Le repiquage des souches de SARM est effectué dans un bouillon BHI. L'incubation a été réalisée dans une étuve à 37°C pendant 24h.

## **VII. Test de synergie sur milieu liquide par la technique des microdilutions**

Selon Bendjeddou et *al.* 2012, la bactériocine produite par *Lb. paracasei* se trouve dans la fraction obtenue avec 30% d'acétonitrile. De ce fait, le test de synergie entre la bactériocine produite par la souche de lactobacilles et la céfoxitine, à l'égard des SARM est réalisé avec cette fraction.

Pour réaliser ce test, des microplaques stériles de 96 puits sont utilisées. 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 µl des solutions à tester sont déposées comme suit :

- première ligne : fraction 30%.
- deuxième ligne : céfoxitine (1<sup>er</sup> puits : 64)
- troisième ligne : céfoxitine + fraction 30%.
- quatrième ligne : MH stérile (témoin + inoculum).

À partir du premier puits de chaque ligne, des dilutions en cascade à ½ sont effectuées en utilisant le bouillon Muller Hinton jusqu'au dernier puits. Ensuite, 50 µl de suspension bactérienne à 10<sup>5</sup> UFC/ml sont ajoutés à tout les puits de toutes les lignes. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24h. La résistance, à l'antibiotique ou à la bactériocine, de la souche est révélée par la présence d'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 concentration plus faibles que les deux antibactériens séparés.

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 :

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

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

PA (2UA) FOX (64µg/ml) Mélange (FOX 10,66 µg/ml et PA 0,33UA) Témoin



**Figure 3 : Méthode de microdilution**

# Résultats et Discussion

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

Le test d'activité du surnageant concentré a montré que la souche de *Lb. paracasei* présente une activité antibactérienne vis-à-vis de la souche de *E. coli* ATCC 25922, avec une zone d'inhibition de 25 mm de diamètre (figure 1).



**Figure 4:** Mise en évidence de l'effet antibactérien de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard de *E. coli* ATCC25922.

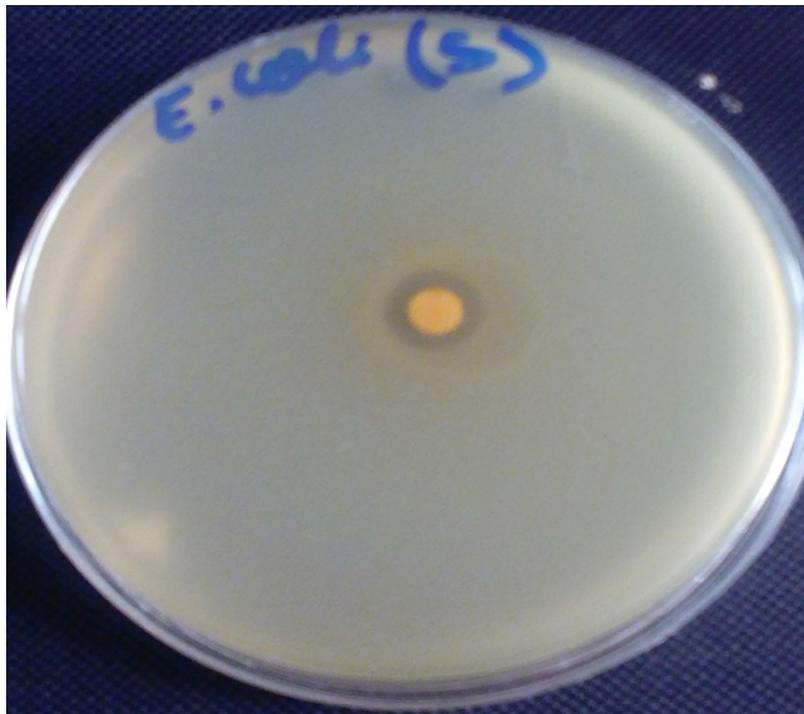
Selon plusieurs auteurs, cet effet antibactérien est dû à l'effet combiné des substances antimicrobiennes produites par les lactobacilles comme les acides organiques essentiellement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, ou encore des substances antimicrobiennes de nature protéiques (bactériocine) (Atanasova et al., 2003 ; Lozo et al., 2007 ; Rousseau, 2004).

## **II. Purification partielle de la bactériocine produite par *Lb. paracasei***

Après la purification partielle de la bactériocine par chromatographie en phase inverse, quatre fractions sont obtenues : 10%, 20%, 30% et 40% d'acétonitrile. Cependant seule la fraction 30% a subi une évaporation sous vide pour éliminer les solvants organiques. Cette fraction est utilisée pour la réalisation des tests d'activité antibactérienne.

## II. 1. Test d'activité antibactérienne de la bactériocine à l'égard d'*E. coli* et SARM

Les résultats obtenus ont montré que la bactériocine partiellement purifiée (fraction 30%) présente une activité antibactérienne à l'égard des souches cibles testées que ce soit résistantes aux antibiotiques ou sensible à ces composés, avec une zone d'inhibition de 11 mm de diamètre pour *E. coli* ATCC25922 et 7 mm de diamètre pour SARM ont été observées (fig.2 et 3).



**Figure 5 :** Test d'activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard d'*E. coli* par la méthode des disques.



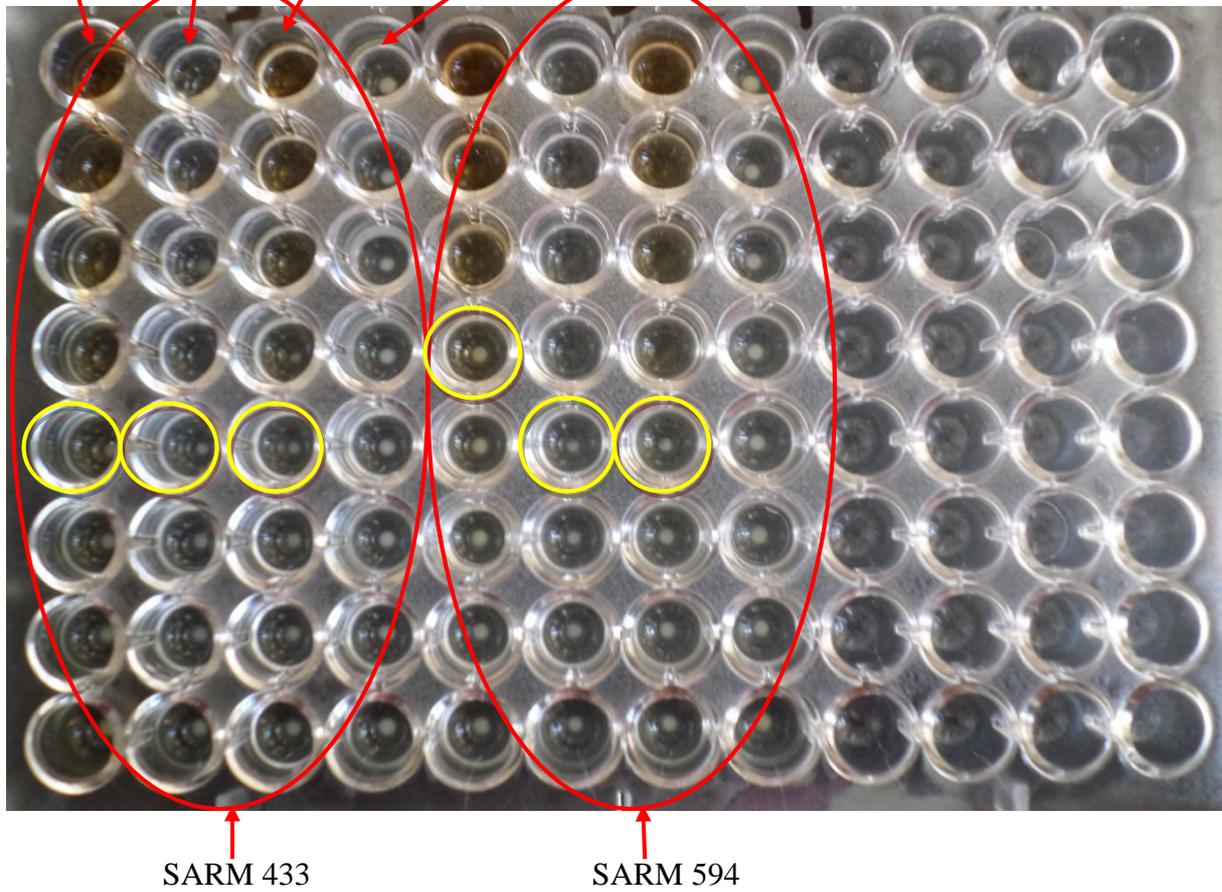
**Figure 6 :** Test d'activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard de *S. aureus* résistante à la méthiciline par la méthode des disques.

D'après Dr Bendjeddou (2013), la fraction obtenue avec 30% d'acétonitrile ne contient qu'une très faible concentration en acide lactique qui ne suffit pas pour avoir un effet antibactérien. De ce fait, l'activité antibactérienne de cette fraction ne peut être attribuée à l'effet de l'acide lactique, ce qui signifie que cette fraction contient d'autre substance responsable de cette activité anti-*E. coli* et anti-SARM. Par conséquent, l'activité antibactérienne de la substance présente dans la fraction 30% est attribuée à la paracaseicine.

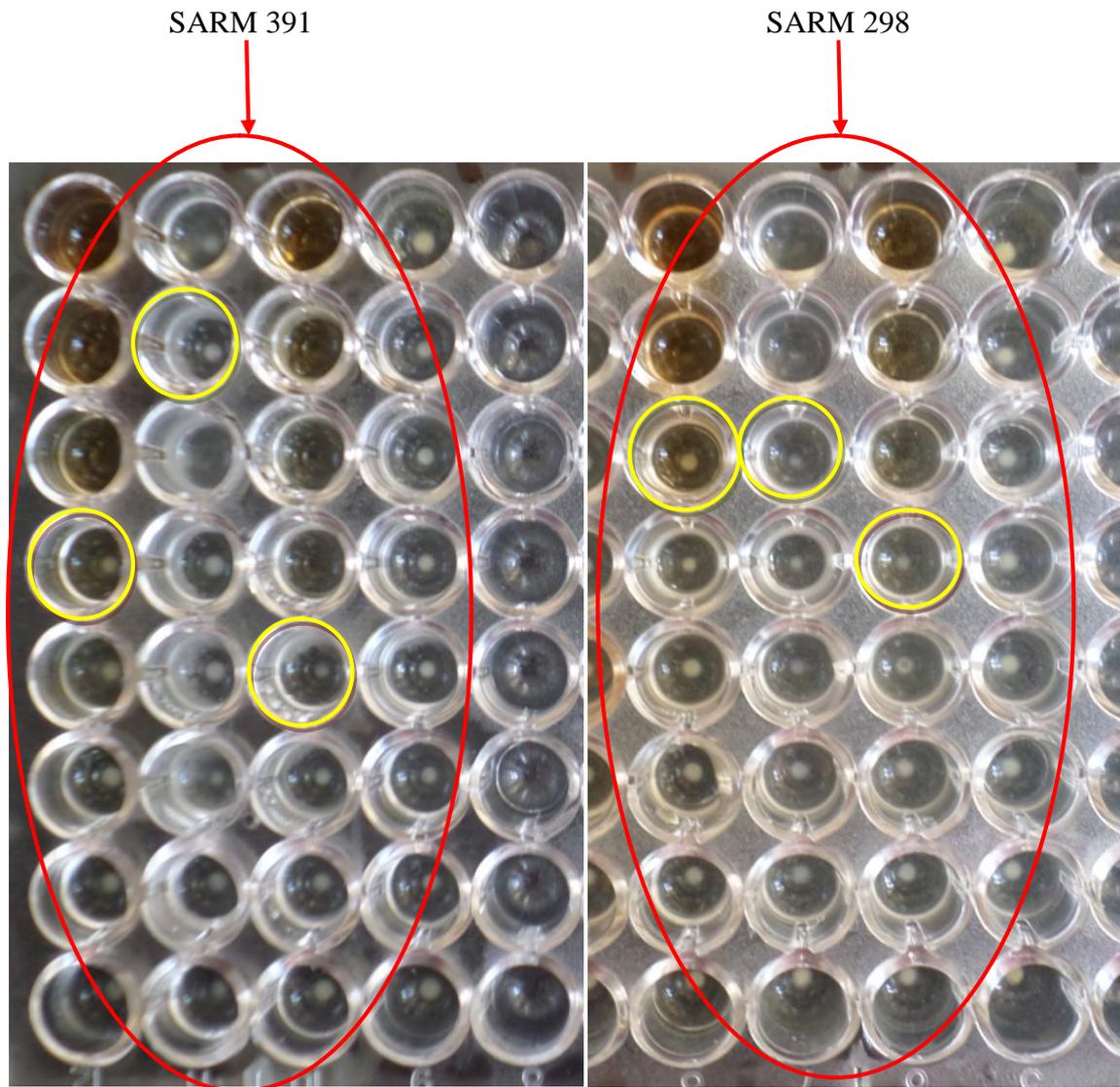
### **III. Test de synergie entre la paracaseicine et la céfoxitine**

L'effet synergique de la paracaseicine A en combinaison avec la céfoxitine est évalué à l'aide de la technique des microplaques. Cette synergie est détectée chez toutes les souches de SARM testées (SARM 594 ; SARM 118 ; SARM 433 ; SARM 298 ; SARM 9384 et SARM 29213). Les résultats sont montrés dans les figures suivantes :

Bacteriocine FOX (FOX + Bacteriocine) Témoin

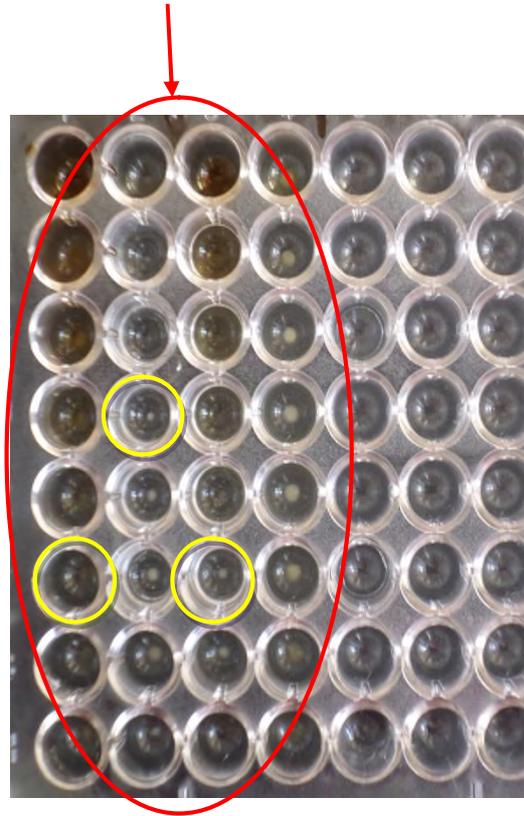


**Figure 7 :** Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* chez les souches : SARM 433, SARM 594.

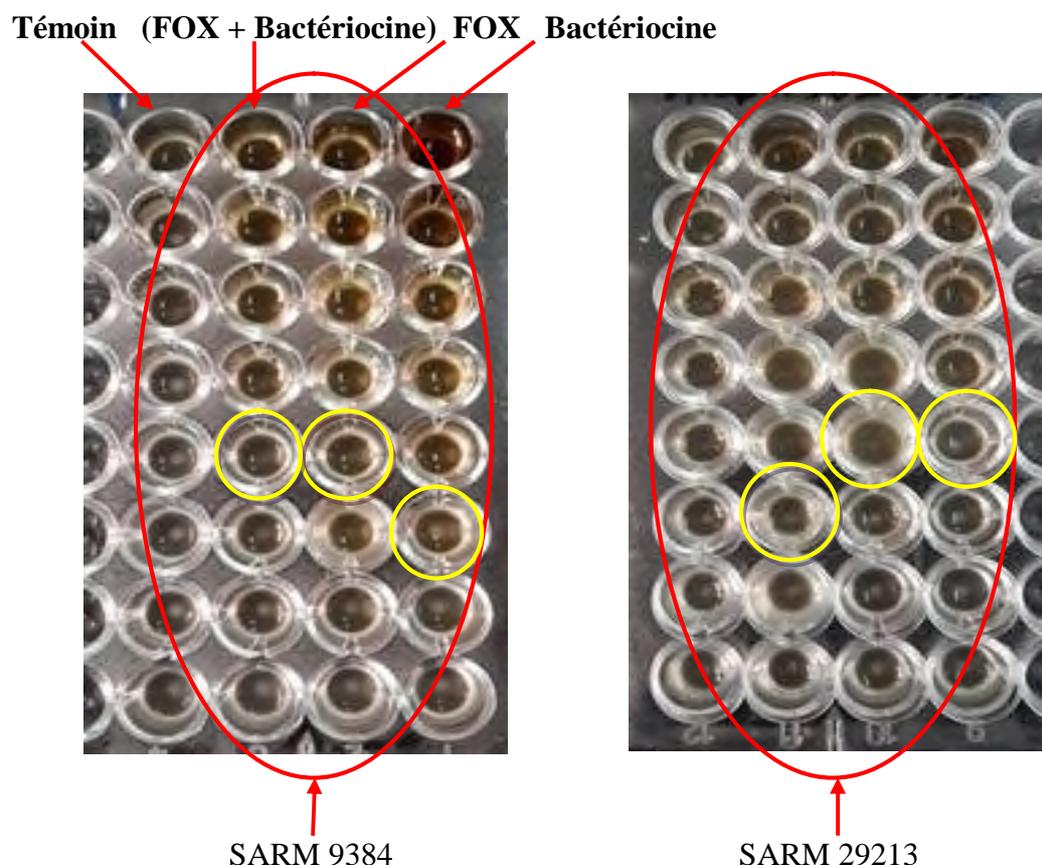


**Figure 8 :** Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* chez les souches : SARM 391 et SARM 298.

SARM 118



**Figure 9 :** Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* chez la souche de SARM 118.



**Figure 10 :** Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine produite par *Lb. paracasei* chez les souches : SARM 9384, SARM 29213.

Les résultats obtenues, indiquent que la paracaseicine A possède une activité antibactérienne contre les souches de SARM et a un effet synergique avec la céfoxitine, en réduisant les CMI de ce dernier. Cette réduction est différente d'une souche à une autre. Le taux maximal de réduction est révélé chez deux souches : SARM 118 et SARM 391 où l'association de la bactériocine à la céfoxitine a permis de réduire, de 06 fois, les CMI de la FOX envers ces souches. De ce fait, la CMI de la FOX passe de 8  $\mu\text{g/ml}$  à 1,33 $\mu\text{g/ml}$  pour SARM 118 ; de 16  $\mu\text{g/ml}$  à 2,66  $\mu\text{g/ml}$  SARM 391 (Tableau IV). Cependant un taux de réduction plus faible est observé chez SARM 9384 ; SARM 29213 et SARM 298 où la CMI de la céfoxitine est passé de 8  $\mu\text{g/ml}$  à 2,66  $\mu\text{g/ml}$  chez SARM 9384 et SARM 29213 et de 16  $\mu\text{g/ml}$  à 5,33  $\mu\text{g/ml}$  chez SARM 298, avec un facteur de réduction de 03 fois. Néanmoins, un effet synergique très faible est noté chez SARM 594 et SARM 433, où les CMI passent de 4  $\mu\text{g/ml}$  à 2,66  $\mu\text{g/ml}$  avec un facteur de réduction de 1,5 fois pour chacune des souches.

**Tableau IV:** Résultats de la synergie de la paracaseicine A (PA) associée à la céfoxitine (FOX).

Les souches de SARM	CMI FOX (µg/ml)	CMI PA (UA)	CMI FOX dans le mélange (µg/ml)	CMI PA dans le mélange (UA)	FICI	Facteur de réduction	synergie
594	4	8	2,66	0,04	0,67	1,5	présence
118	8	32	1,33	0,02	0,16	6	Présence
433	4	16	2,66	0,04	0,66	1,5	présence
298	16	4	5,33	0,08	0,35	3	Présence
391	16	4	2,66	0,33	0,24	6	Présence
9384	8	16	2,66	0,04	1	3	présence
29213	8	8	2,66	0,04	0,37	3	présence

Selon CASFM 2016 la CMI de la céfoxitine soit  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  —→ SARM.

Chez les bactéries à Gram positif responsables d'infections communautaires et nosocomiales, l'association de résistances naturelles et acquises aux antibiotiques confère une importance particulière à la prise en charge thérapeutique. Chez ces bactéries, le mécanisme prépondérant est lié à des modifications au niveau des cibles des antibiotiques, il s'agit d'une modification quantitative et/ou qualitative des protéines de liaison à la pénicilline attribuant aux staphylocoques une résistance à la méthicilline. L'association à d'autres mécanismes de résistance (enzymes, efflux) est responsable du caractère souvent multirésistant des souches nosocomiales (**Quincampoix et Mainardi, 2001**)

Les maladies infectieuses sont la seconde principale cause de décès dans le monde et le troisième dans les pays développés. Les bactéries à Gram positif multirésistantes vont continuer à croître en importance dans les hôpitaux et dans les communautés avec de fortes proportions des patients vulnérables et d'utilisations de quantités excessives d'antibiotiques (**Morelle et al., 2010**).

La diversité des mécanismes de résistances chez des organismes multirésistants rend le développement efficace de nouveaux agents antimicrobiens très difficile. Pour résoudre ce problème, on a de plus en plus besoin de rechercher de nouveaux composés actifs contre les agents pathogènes multi-résistants (**Rice, 2007**).

Parmi les alternatives à proposer est l'association de ces antibiotiques à d'autres substances antimicrobiennes afin de réduire leurs CMI. Cela implique l'étude de l'effet synergique entre ces substances et les antibiotiques vis-à-vis des souches multirésistantes. Les composés antibactériens utilisés dans ce travail est la céfoxitine (FOX) et la paracaseicine A.

Les résultats de l'association de la céfoxitine à la paracaseicine A semi-purifiée, ont montré que cette association a abouti à une synergie entre les deux composés antibactériens chez les sept souches multi-résistantes testées. Cette synergie a permis de réduire la CMI de la céfoxitine. La réduction est révélée chez les souches SARM 118, SARM 391 avec un facteur égal à 6 fois, chez SARM 298 ; SARM 29213 et SARM 9384 avec un facteur de réduction égale à 3 fois pour chacune des souches.

Le mécanisme d'action des bactériocines passe par plusieurs étapes, la fixation de la bactériocine sur la membrane cible constitue la première et l'ultime étape du mécanisme

d'action. Cette interaction est souvent de nature électrostatique (**Che et al., 1997a**). C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité. Puis elle se suit par l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique pour la formation de pore, ce qui conduit à la mort cellulaire (**Huang, 2006**). Toutefois, certaines bactériocines agissent sur leurs bactéries cibles sans formation de pores. En effet, ces bactériocines se fixent sur le lipide II et provoquent une translocation de ce lipide du septum, ce qui inhibe la synthèse de la paroi (**Hasper et al., 2006**). Un autre mécanisme d'action est décrit chez certain bactériocines, c'est la formation d'un complexe avec le lipide II ce qui constitue une barrière physique empêchant la transpeptidation et la transglycosylation, deux étapes importantes pour la synthèses de la paroi cellulaire (**Wiedemann et al., 2006a**).

De ce fait, la synergie entre la céfoxitine et la paracaseicine A pourrait être expliquée par deux mécanismes :

- La formation de pore abouti à la perte de composés cellulaires importants comme l'ATP, les ions ( $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^+$ ,  $Mn^+$ ....etc.), les acides aminés et les bases nucléotidiques, ce qui fragilise la cellule bactérienne et la rend plus vulnérable à l'action de la céfoxitine.
- La liaison de la bactériocine avec le lipide II sans formation de pores transmembranaires, renforce et augmente davantage l'action de la céfoxitine par inhibition de la synthèse de la paroi.

Le but de ce travail été d'évaluer l'effet synergique entre la céfoxitine et la paracaseicine A, une bactériocine produite par *Lb. paracasei*, vis-à-vis des souches de SARM. Pour répondre à cet objectif, la sensibilité de SARM à la paracaseicine A seule et en combinaison avec la céfoxitine (effet synergique) a été démontrée par la technique des microdilution.

La synergie entre la céfoxitine et la bactériocine a permis de réduire les CMI de la céfoxitine. Cette réduction est variable selon les souches de SARM. Le taux maximal de réduction est révélé chez deux souche : SARM 118 et SARM 391 où l'association de la bactériocine à la céfoxitine a permis de réduire les CMI de ces souches : de 8 µg/ml à 1,33 µg/ml chez SARM 118 et de 16 µg/ml à 2,66 µg/ml chez SARM 391, avec un facteur de réduction égale à 06 fois. Cependant un taux de réduction plus faible est observé chez SARM 9384 ; SARM 29213 et SARM 298 où la CMI de la céfoxitine est passée de 8 µg/ml à 2,66 µg/ml chez SARM 9384 et de 16 µg/ml à 5,33 µg/ml chez SARM 29213 et SARM 298, avec un facteur de réduction égale 03 fois. La synergie la plus faible est rencontrée chez SARM 594 et SARM 433, avec un facteur de réduction égale à 1,5 fois.

En perspectives, les résultats obtenus restent préliminaire et mérite d'être exploiter et compléter par :

- Élargir l'étude sur d'autres bactéries à Gram positif responsable d'infections nosocomiales.
- L'utilisation d'une bactériocine pure pour confirmer les résultats obtenus.
- Déterminer la CMI de la bactériocine pure permettant d'avoir une synergie maximal.
- Réalisation des tests *in vivo* pour vérifier l'efficacité clinique de la synergie.

## A

**Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarrrondo M., chobert J. M., Dousset X., Ivanova I. et Haertle T. (2003).** Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by AAA *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol.*, 87: 63-73.

## B

**Bendjeddou K. (2013).** Effet anti-EPEC de *Lactobacillus paracasei* additionné à un lait infantile au lactosérum : caractérisation de sa bactériocine. *Thèse de Doctorat*.

**Bendjeddou K., Fons M., Strocker P., Sadoun D. (2012).** Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK 2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 1543-1552.

**Boerlin P. et White D. G. (2006).** Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, *Fourth Edition*. Blackwell Publishing, California, USA, p. 27-43.

**Boyle-Varra S. et Daum R. S. (2007).** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine Leukocidin. *Lab Invest*, 87(1): 3-9.

**Brogden K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Natur. Rev. Microbiol.*, 3(3): 238-5.

## C

**Canly J. (2002).** Antimicrobial resistance in Canada. *CMAJ*, 167: 885-91.

**Cavallo J. -D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. et Garrabé E. (2004).** Bêtalactamines Bêta-lactam antibiotics. *EMC – Maladies Infectieuses*, 1: 129-202.

**Chen Y., Ludescher R. D. et Montville T. J. (1997).** Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(12): 4770-7.

**Chu Y. W., Cheung T. K., Chu M. Y., Tsang V. Y., Fung J. T., Kam K. M. et Lo J. Y. (2009).** Resistance to tetracycline, erythromycin and clindamycin in *Streptococcus suis* serotype 2 in Hong Kong. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34(2): 181-2.

**Codex Alimentarius Commission. (2011).** Draft guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance. In: Report of fourth session of the Codex ad hoc Intergovernmental Task Force on Antimicrobial Resistance, *Muju, Republic of Korea*, 25-49.

## ***D***

**De Vuyst L. et Leroy F. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13(4): 194-9.

**De Vuyst L et Vandamme E. J. (1994).** Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. Bacteriocins of lactic acid Bacteria: *Microbiology, genetics and applications*. D. V. L. a. V. E. J. *Lodon, England, blackie Academic and professional*, pp 151-221.

**Durand G. et Meuguier H. (2006).** Detection of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Containing the Toxic Shock Syndrome Toxic 1 Gene Responsible for Hospital- and Community-Acquired Infection in France. *J. Clin. Microbiol.*, 44(3): 847-853.

## ***E***

**Ennahar S., Deschamps N. et Richard J. (2000).** Natural variation in susceptibility of *Listeria strains* class IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.*, 41(1):1-4.

## *H*

**Hammami R., Fernandez B., Lacroix C. et Fliss I. (2013).** Anti-infective properties of bacteriocins: an update, *Cell. Mol. Life Sciences*, 70(16): 2947-2967.

**Harbottle H., Thakur S., Zhao S. et White D. G. (2006).** Genetics of antimicrobial resistance. *Anim. Biotechnol.*, 17: 111-124.

**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.

**Hiramatsu K., Cui L. et Kuroda M. (2007).** The emergence and evolution of methicillin-resistance *S-aureus*. *Trends. Microbiol.*, 9(10): 486-93.

**Ho PL., Cheung C. et Mak G. C. (2007).** Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 57(2): 145-51.

**Hsu S. T., Breukink E., Bierbaum G., Sahl H. G., Kruijff B., Kaptein R., Van Nuland N. A. et Bonvin A. H. (2003).** NMR Study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles conformational changes are a key to antimicrobial activity. *J. Biological. Chemistry.*, 278(15): 13110-7.

**Huang H. W. (2006).** Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1758(9): 1292-302.

## I

**Ito T., Katayama Y. et Hiramatsu K. (1999).** Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1449-58.

## J

**Jack R. W., Tagg J. R. et Ray B. (1995).** Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59(2): 171-200.

**Johnston A. M. (1998).** Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *BMJ*, 317: 665-667.

## K

**Katayama Y., Ito T. et Hiramatsu K. (2000).** A new class of genetic element, Staphylococcus Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(6): 1549-55.

**Klanenhammer T. R. (1988).** Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochi, North Carolina State University, USA*, 70(3): 337-349.

**Kruszewska D. (2004).** mersacidine éradique *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM) dans un modèle de souris de la rhinite. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54: 648-653.

**Kuehnert M., Kruszon-Moran D. et Hill H. A. (2006).** Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J. Infect. Dis.*, 193: 172-9.

## *L*

**Leroy F., Lievens K. et De Vuyst L. (2005).** Modeling bacteriocin resistance and inactivation of *Listeria innocua* LMG 13568 by *Lactobacillus sakei* CTC 494 under sausage fermentation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11): 7567-70.

**Long k. S., Poehsgaard J., Kehrenberg C., Schwarz S. et Vester B. (2006).** The cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutlins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents chemother.*, 50: 2500-2505.

**Lowy F. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. *N. Eng. J. Med.*, 339: 520-32.

**Lozo J., Jovicic B., Kojic M., Dalgalarondo M., Haertle T. et Topisirovic L. (2007).** Molecular characterization of a novel Bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr. Microbiol.*, 55: 266-271.

## *M*

**Meghrous S., Fliss I., Bouksaim et Lacroix C. (1999).** Digoxigenin-labeled probe for rapid identification of nisinogenic *Lactococcus lactis* strains. *FEMS. Microbiol. Letters*, 171(1): 43-8.

**Morelle A. et Balkin D. M. (2010).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Pervasive Pathogen Highlights the need for new antimicrobial development. *Yale J of Bio and Med.*, 83(4): pp, 223-233.

**Morency H., Mota-Meira G., LaPointe C., Lacroix et Lavoie M. C. (2001).** Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian J. Microbiol.*, 47(4): 322-31.

**Muylaerta A. et Mainil J.G. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques: les mécanismes et leur « contagiosités». *Ann. Méd. Vét.*, 156: 109-123.

## *N*

**Naghmouchi K., Baah J., Hober D., Jouy E., Rubrecht C., Sané F. et Drider DJ. (2013).** Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential To Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57(6): 2719-2725.

**O'Brien F. G., Coombs G. W. et Pearson J. C. (2005).** Type V Staphylococcal Cassette Chromosome mec in community staphylococci from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(12): 5129-32.

**Okkes D. J., Dicks L. M. T., Silvester J., Joubert J. et Odendaal H. J. (1999).** Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolate from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.*, 87(5): 726-734.

**O'Sullivan L., Ross R. P. et Hill C. (2002).** Pontential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie. View Editorial Board. Ireland.* 84(5-6): 593-604.

## *P*

**Pascual L. M., Daniele M. B., Walter G., Pajaro M. C. et Barberis I. L. (2008).** Purifications and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr. Microbiol.*, 56: 397-402.

**Piddock L. J. (1996).** Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J. Antimicrob. Chemother.*, 38: 1-3.

**Pinho M. G., De Leucastre H. et Tomasz A. (2000).** Cloning characterization, and inactivation the Gene pbpc, Encoding Penicillin-Binding Protein 3 of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 182: 1074-1079.

## **Q**

**Quincanpoix J. C. et Mainardi J. L. (2001).** Mécanisme de résistance des cocci à Gram positif. *Serv. Microbiol. Clin.*, 6756(1): 00114-1.

## **R**

**Rice L. B. (2007).** Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram negative bacteria. *Cleve. Clin. J. Med.*, 74. supplement 4: S12-20.

**Rousseau V. (2004).** Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la flore vaginale humaine. *Thèse de Doctorat, Toulouse, France*, 164p.

## **S**

**Sahel H. G. et Bierbaum G. (1998).** Lantibiotique: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 52: 41-79.

**Shor A. C., Rossney A. S. et O'Comell B. (2008).** Detection of *Staphylococcal* Cassette Chromosom mec-Associated DNA segments in Multiresistant Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and identification of *Staphylococcus epidermidis* ccr B4 in both Methicillin-Resistant *S. aureus* and MSSA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(12): 4407-19.

## **T**

**Tankovic. (2000).** Mécanisme d'action des antibiotiques. In Précis de Bactériologie Clinique. ESKA, 585-594.

**Tong Z., Zhang Y., Ling J., Ma J., Huang L. et Zhang L. (2014).** An *in vitro* study on the effects of nisin on the antimicrobial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. Plos One 9(2): e89209.

## **V**

**Vandenesch F., Naimi T. et Enright M. C. (2003).** Community-acquired methicillin-resistant valentine leukocidin genes: world wide emergence. *Emergy. Infect. Dis.*, 9: 978-84.

## **W**

**Wang Y., Li D., Sang L., He T., Liu H., Wu C., Schwarz S. et Shen J. (2013).** First report of the multiresistance gene *cfr* in *Streptococcus suis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57: 4061-4063.

**Wiedemann I., Bottiger T., Boneli R. R., Schneider T., Sahl H. G. et Martinez B. (2006).** Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2809-14.

## **Z**

**Zetola N., Francis J. S. et Nuemberger E. L. (2005).** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis.*, 5(5): 275-86.

## Annexe

### 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 : Bouillon MRS (PH = 6,5).**

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°IV : Bouillon Muller Hinton (PH = 7,3).**

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

**Tableau N°V : Bouillon Cœur Cervele (PH = 7,4).**

<b>Composition</b>	<b>Quantité g /l</b>
Extrait cœur-cervele	17,5
Peptone pancréatique	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate disodique	2,5
Glucose	2,0

## Résumé

**Objectif:** Etude de l'efficacité de la paracasricine A produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, et son effet synergique en association avec la céfoxitine à l'égard des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la mitchiline.

**Méthode et résultats:** Dans ce but, une souche de *Lactobacillus paracasei* productrice de la paracaseicine A et sept souches de SARM ont été utilisées. L'activité de la bactériocine a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé Muller Hintone. Les effets synergiques issus de l'association de la bactériocine à la céfoxitine ont été mis en évidence par la technique des microdilutions.

Les résultats obtenus montrent des synergies chez toutes les souches de SARM testées, par la réduction des CIMs de la céfoxitine: de 8 µg/ml (FOX seul) à 1,33 µg/ml chez SARM 118 ; de 16 µg/ml à 2,66µg/ml chez SARM 29213 et SARM 391, avec un facteur de réduction égale à 06 fois. Cependant un taux de réduction très faible est observé chez SARM 9384 et SARM 298 où la CMI de la céfoxitine est passé de 8 µg/ml à 2,66 µg/ml chez SARM 9384 et de 16 µg/ml à 5,33 µg/ml chez SARM 298, avec un facteur de réduction égale à 03 fois. tandis que, un effet synergique faible est noté chez SARM 594 et SARM 433, avec des CMI allant de 4 µg/ml à 2,66 µg/ml et un facteur de réduction égale à 1,5 fois pour chacune des souches.

**Conclusion:** nos résultats indiquent que l'effet synergique de la bactériocine en association avec la céfoxitine réduit significativement les CMI de ce dernier.

**Mots clés:** Bactériocine, Céfoxitine, Synergie, SARM, CMI.

## Summary

**Objective:** Study of the efficiency of paracasricin A produced by *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, and its synergistic effect in combination with the céfoxitin against *Staphylococcus aureus* strains resistant to mitchiline.

**Methods and Results:** For this purpose, a strain of *Lactobacillus paracasei*, paracaseicin A producer and seven MRSA strains had been used. The bacteriocin activity was determined using the diffusion method in Muller Hinton's medium agar. The synergistic effects derived from the combination of the bacteriocin to the cefoxitin were identified by the micro dilutions technique.

The results obtained show synergy in all the MRSA strains tested, by reducing MICs of the cefoxitin: from 8 µg/ml (FOX only) to 1.33 µg/ml in MRSA 118; from 16 µg/ml to 2,66µg/ml in MRSA 29213 and MRSA 391, with a reduction factor equal to 06 folds. However, a very low reduction rate was observed in MRSA 9384 and MRSA 298 where the MIC of the cefoxitin from 8 µg/ml to 2.66 µg/ml, in MRSA 9384 and from 16 µg/ml to 5, 33 µg/ml in MRSA 298 with a reduction factor equal to 03 folds. While a low synergistic effect was noticed in MRSA 594 and MRSA 433, with MIC ranging from 4 µg/ml to 2,66 µg/ml and a reduction factor of 1.5 folds for each strain.

**Conclusion:** Our results indicate that the synergistic effect of the bacteriocin in combination with cefoxitin significantly reduced MICs of the céfoxitin.

**Keywords:** Bacteriocin, Cefoxitin, Synergy, MRSA, MIC.