

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 moléculaire et médicale



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

Master

Thème

Contribution à l'étude de l'effet synergique
de la céfoxitine et de la paracaseicine A
semi-purifiée à l'égard de *Staphylococcus*
aureus résistant à la méthicilline

Présenté par :

CHALAL Tamazight & IFTISSEN Fahima

Soutenu le : 29 juin 2017

Devant le Jury composé de :

Melle. BENDALI F.

MCA

Présidente

M. BENDJEDDOU k.

MCB

Encadreur

Mme. GHAROUT A.

MCB

Examinatrice

Année Universitaire : 2016/2017

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre enseignant et promoteur, Monsieur BENDJEDDOU K, d'avoir accepté de nous encadrer, pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée, pour sa confiance, son encouragement et son œil critique qui nous a été très précieux pour améliorer la qualité de notre mémoire. L'apport de ses sincères soutiens ne s'est pas limité au cadre formel du travail, mais a été une grande source de motivation pour continuer et accomplir ce travail. Veuillez trouver ici, monsieur, l'expression de notre sincère reconnaissance.

Nos remerciements les plus vifs vont à Melle BENDALI F. et Mme. GHAROUT A. qui nous font honneur par leur présence parmi le jury et ont accepté de consacrer de leur temps pour juger et examiner ce travail. Elles ont tout notre respect pour cela.

Merci au chef du département M. DJOUDI F. et à l'adjoint au chef du département M. BOUKHALFA F. pour leur soutien.

A tous nos enseignants qui ont veillé à notre formation durant notre cursus.

Nous tenons à présenter toute notre gratitude aux ingénieurs du laboratoire de microbiologie 1 et 2, qui ont veillé à ce que nous ne manquions de rien ainsi qu'au bon déroulement de notre stage au sein de leurs laboratoires.

*Nos remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe **Interactions Microbiennes, biofilms et probiotiques** du laboratoire de recherche en microbiologie appliquée (LMA) pour nous avoir si chaleureusement accueilli parmi eux, pour leur sympathie, leur dévouement et leur gentillesse.*

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, que Dieu les garde pour moi et les protège de toute peine

A ma petite sœur Sirem, mon frère Amgoud,

A ma valeureuse grand-mère « Setti Reġia » à qui je souhaite un prompt rétablissement

A mes chères tantes Houa et Djamila ainsi que leurs maris

A mes cousines et cousins,

A mon très cher Djamel Eddine qui a toujours su être là et à toute sa famille,

Et à tous mes enseignants qui ont su nous inculquer leur savoir et leur savoir faire durant ces deux dernières années de Master.

Sans oublier ma binôme : Fahima ainsi que ses proches.

A tous mes amis(es).

A tous mes camarades de la promotion Microbiologie Moléculaire et Médicale 2016/2017.

A tous les étudiants en Microbiologie Alimentaire Santé auprès de qui j'ai travaillé au laboratoire, particulièrement Kahina, Alima, Gouraya, Asma, Meriem, Zahia, Houria et tous les autres.

Et à tous ceux qui me sont chers.

Chalal Tamazight.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- ❖ *A mes très chers parents*
- ❖ *A mes frères, Toufik et Billal*
- ❖ *A mes sœurs, Wissam, Wardia, Nabila, Kamilia et son mari*
- ❖ *Ma Nièce, Alicia*
- ❖ *A mon binôme et toute sa famille*
- ❖ *A tous ceux qui me sont très chers.*

Iftissen Fahima.

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNr : Acide Désoxyribonucléique Ribosomique

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

BHI : Brain Heart Infusion

BMR : Bactérie Multirésistante

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

CIP : Ciprofloxacine

CLR : Claretromycine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DA: Clindamycine

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA: Food and Drug Administration

FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index

FOX : Céfoxitine

HE : Huile Esentielle

Liste des abréviations (suite)

Lb: *Lactobacillus*

MHB: Mueller Hinton Broth

MRS: Man Rogosa et Sharpe

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OIE : Office internationale des Epizooties (actuellement, organisation mondiale de la santé animale)

PA : Paracaseine A

PAM : Peptide Antimicrobien

PCA : Plate Count Agar

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline

SARM-C : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline Communautaire

SARM-HA : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline Hospitalier

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SCC*mec* : Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*

Subsp. : Sous Espèce

TE : Tétracycline

TFA : Acide Trifluoroacétique

UA : Unité Arbitraire

UFC : Unité Formant Colonies

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
1	Evaporation sous vide du surnageant de la culture de <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> .	10
2	Installation de la colonne chromatographique effectuée sur gel de silice C18 de type Discovery DSC-18.	12
3	Technique des microdilutions en microplaque.	13
4	Activité antibactérienne de <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> à l'égard d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 révélée par le test des puits.	15
5	Activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 révélée par le test des puits.	16
6	Activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard de SARM 391 révélée par le test des puits.	17
7	Activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard de SARM 810 révélée par le test des puits. .	17
8	Test de synergie de la céfoxitine et de la paracaseicine A chez les souches : SARM 594 et SARM 637.	18
9	Test de synergie de la céfoxitine et de la bactériocine chez les souches de SARM : SARM 936 et SARM 363.	19
10	Test de synergie de la combinaison paracaseicine A et céfoxitine chez les souches : SARM 298 et SARM 433.	20
11	Test de synergie de la céfoxitine et de la paracaseicine A chez les souches de SARM : SARM 391 et SARM 810.	21

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
I	Caractéristiques des souches bactériennes utilisées comme souches cibles.	8
II	Préparation d'un gradient croissant et discontinu d'acétonitrile dans la solution de TFA à 0,05%.	11
III	Résultats de la synergie de la paracaseicine A (PA) en combinaison avec la céfoxitine (FOX).	22

Liste des tableaux en annexe

Tableau N°	Titre
I	Composition du bouillon nutritif
II	Composition du bouillon MRS
III	Composition du bouillon Mueller Hinton
IV	Composition du bouillon Cœur Cerveille (BHI)
V	. Composition de la gélose PCA
VI	Composition de la gélose Mueller Hinton

Table des matières

Partie I : Problématique

Problématique.....	01
--------------------	----

Partie II : Matériel et méthodes

I. Origine des souches utilisées.....	08
II. Revivification de la souche de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	09
III. Vérification de l'activité antibactérienne de <i>Lb. paracasei</i> à l'égard d' <i>E. coli</i> ATCC 25922	09
IV. Extraction de la paracaseicine A.....	10
IV.1. Réalisation de la chromatographie en phase inverse.....	10
IV.1.1. Préparation de la colonne.....	11
V. Repiquage des souches de SARM.....	12
VI. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la fraction 30% vis-à-vis des souches de SARM et d' <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	12
VII. Test de synergie en milieu liquide par la technique des microdilutions.....	13

Partie III : Résultats et discussion

I. Vérification de l'activité antagoniste de <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> à l'égard d' <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	15
II. Purification partielle de la paracaseicine A.....	16
III. Test d'activité antibactérienne de la paracaseicine A à l'égard d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 et SARM.....	16
IV. Test de synergie entre la paracaseicine A et la céfoxitine.....	18
Discussion.....	24
Conclusion.....	26

Références bibliographiques

Annexes

Partie I

Problématique

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**). Pendant les dernières décennies, il y a eu des soucis concernant la possibilité de la diffusion de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement (**Benabbou, 2012**).

Selon la **Commission Européenne (2005)**, on a estimé que d'une à dix millions de tonnes d'antibiotiques ont été déchargées dans la biosphère au cours des 60 dernières années. Une grande partie du souci concerne des bactéries pathogènes et leurs résistances, puisque les infections provoquées par ces micro-organismes résistants sont non seulement plus compliquées à traiter, mais le traitement requis est beaucoup plus coûteux, plus intensif et plus long dans ces cas. Par exemple l'antibiorésistance de *staphylococcus aureus* seule cause 20 000 décès par an en Europe.

En effet, les maladies infectieuses sont la seconde principale cause de décès dans le monde et la 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 Balkin, 2010**).

Les différentes causes de l'antibiorésistance semblent s'être accélérées dans l'espace et le temps, avec plusieurs explications possibles et complémentaires (**Benabbou, 2012**) : l'utilisation massive des antibiotiques par l'homme, dans la deuxième moitié du 20^{ème} siècle a exposé un grand nombre de bactéries, pathogènes notamment, à des antibiotiques (**Singer et al., 2003**). Diverses études ont démontré que le mode d'utilisation des antibiotiques comme phytopharmaceutiques sur des plantes, comme adjuvant alimentaires ou médicament chez les animaux d'élevage, poisson compris, et comme médicament chez l'Homme, influent fortement sur le nombre de microorganismes résistants qui se développent (**Teale, 2002**). De plus, une utilisation excessive des antibiotiques à large spectre, comme la deuxième et la troisième génération de céphalosporines, entraîne une résistance à la méthicilline (**Benabbou, 2012**). Enfin l'usage abusif d'antibiotiques par des éleveurs a augmenté le risque comme cela a été décrit dans le rapport de la Commission d'Alimentation des Etats Unis en 1972 (**Report Commission 1972**). Les cultivateurs, par exemple, utilisent l'antibiotique comme complément alimentaire pour une croissance accélérée des animaux d'élevage, ou pour lutter

contre le feu bactérien ont encore favorisé la diffusion de mécanismes bactériens d'antibiorésistance. Dès les années 1980, il a été montré que ces antibiorésistances pouvaient affecter les consommateurs **(Corpet et al., 1988)**.

Cependant, de nombreuses réflexions autour de la lutte contre l'antibiorésistance se sont développées dès les années 1990, sous l'égide des organisations internationales, la FAO, l'OMS et l'OIE. Ainsi, des lignes directrices sur la surveillance de la résistance et des consommations d'antibiotiques en médecine vétérinaire ont été adoptées. En juillet 2011, la commission du *Codex alimentarius* (organisation créée par la FAO et l'OMS) a adopté les «Lignes directrices pour l'analyse des risques d'origine alimentaire liés à la résistance aux antibiotiques». De plus, l'utilisation en élevage des antibiotiques comme facteurs de croissance est interdite dans l'Union Européenne depuis 2006.

La résistance aux antibiotiques peut être soit naturelle, soit acquise. Cette antibiorésistance reste d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans des éléments mobiles, comme plasmides, éléments transposables ou intégrons (résistance extra-chromosomique) **(Mandell et al., 2009)** pour être transmis verticalement et horizontalement **(Muylaert et Mainil, 2012)**.

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)**.

Alors qu'il s'agit d'un agent commensal parmi les plus fréquents de notre flore normale, *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène redoutable qui a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique. La plasticité de son génome lui confère la capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales, et notamment d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques **(Dumitrescu et al., 2010)**.

Ainsi, dès 1941, sont apparus les staphylocoques résistants à la pénicilline, grâce à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique, enzyme dégradant la pénicilline. La résistance à la pénicilline initialement restreinte au milieu hospitalier, a très vite diffusé en milieu communautaire et concerne actuellement plus de 90% des souches de *S. aureus*. Pendant les années 1950 sont apparues les souches de *S. aureus* multirésistantes. L'introduction en 1959 de la méthiciline, dérivé semi-synthétique de la pénicilline, pour le traitement des infections staphylococciques a soulevé un grand espoir. Mais à peine 2 ans plus tard (1961), les premières souches hospitalières de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) sont apparues dans un hôpital de Grande-Bretagne (**Oliveira et al., 2002**).

Le secret de ce pouvoir d'adaptation a été percé par le séquençage du génome de *S. aureus* effectué par les équipes de Baba et d'Hiramatsu (**Kuroda et al., 2001**). Ainsi, il s'est avéré que la résistance des SARM est due à l'acquisition du gène *mecA*, fragment d'ADN de 2,1 Kb codant une protéine liant la pénicilline additionnelle (PLP2a) (**Ito et al., 2003**). Cette PLP2a ou PLP2' a une affinité faible vis-à-vis des β -lactamines. Les souches de *S. aureus* possédant le gène *mecA* sont donc résistantes à toute la famille des β -lactamines. Le gène *mecA* est inclus dans un élément génétique mobile : la cassette staphylococcique (SCC*mec* : Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) (**Hiramatsu et al., 2001**).

La cassette SCC*mec* comporte deux éléments essentiels : le complexe du gène *mecA* et un complexe de gènes codant des recombinases *ccr* (cassette chromosomal recombinase genes A and B « *ccrAB* » ou « *ccrA* » et « *ccrB* ») qui assurent les phénomènes d'intégration et d'excision de la cassette (**Ito et al., 2003 ; Katayama et al., 2000 ; IWG-SCC, 2009**). L'origine de cette cassette de résistance demeure inconnue. Cependant, différents indices orientent vers l'hypothèse d'un échange horizontal entre *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative (SCN) (**Takeuchi et al., 2003**). Cependant le séquençage d'une souche de *Micrococcus caseolyticus* résistante à la méthicilline a révélé l'existence d'un complexe *mec*, *mecIRA_m*, qui pourrait être un précurseur de l'actuel complexe *mec* de *S. aureus* (**Tsuhakishita et al., 2010**). De ce fait, en dehors des mutations spontanées, *S. aureus* diversifie son génome grâce aux échanges de matériel génétique avec d'autres espèces bactériennes par des phénomènes de transfert horizontal de gènes (**Bukharie et al., 2001**).

Les premiers cas d'infection à SARM ont été rapportés il y a plus de trente ans et revêtaient un caractère nosocomial. Néanmoins, depuis les années 1990, les infections à SARM se sont multipliées chez des patients n'ayant aucun facteur de risque traditionnel

d'acquisition de SARM qui peut être liée soit à une hospitalisation récente, soit à l'exposition prolongée et récurrente aux antibiotiques : il s'agit des infections en communauté dues à SARM (**Bukharie et al., 2001**). Les souches de SARM isolées dans ce contexte, SARM-C, ont des caractéristiques permettant de les différencier des souches de SARM associées au milieu hospitalier (**Dufour et al., 2002**).

Aujourd'hui, on connaît des souches résistantes à toutes les classes d'antibiotiques connues. Ce danger potentiel a amené les scientifiques à revoir la façon d'utiliser les antibiotiques et à chercher d'autres agents antimicrobiens dont la structure et le mode d'action, différents de ceux des antibiotiques, permettraient de pallier ces phénomènes de résistances (**Morrisset, 2011**). De ce fait, les bactériocines pourraient être considérées comme une alternative au contrôle de la prolifération et à l'inhibition des souches bactériennes pathogènes devenues résistantes aux antibiotiques usuels.

Il existe plusieurs définitions du terme bactériocine. A l'origine, ce terme a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique. Plus précisément, les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne. Ainsi les bactériocines, peuvent être isolées chez de nombreuses bactéries et archées (**Klaenhammer, 1988**). Deux grands groupes de bactériocines peuvent être distingués avec, d'une part, les bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif, et d'autre part, celles produites par des bactéries à Gram positif (**Jack et al., 1995, Tagg et al., 1976**), notamment les bactériocines de bactéries lactiques (**Morrisset, 2011**).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques et amphiphile, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 KDa (**Nissen-Meyer et al., 1997 ; Heng et al., 2007**), ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs (**Todorov et al., 2011**).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (**Cotter et al., 2005 ; Belguesmia et al., 2011**). Cependant, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus*, *Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines (**Morency et al., 2001**). En effet, certaines bactériocines sont actives contre les pathogènes d'origine alimentaire ou les bactéries responsables d'altération. Elles ont un spectre d'action très variable (**de Vuyst et Vandamme, 1994**). Certaines bactériocines

possèdent une activité antimicrobienne plus vaste qui peut même s'étendre jusque chez les levures, les moisissures, les spermatozoïdes et même les virus (**Raddey et al., 2004**).

La découverte des bactériocines remonte au début du vingtième siècle lorsque Gratia (1925) démontre l'existence d'une substance inhibitrice, thermostable, provenant d'un dialysat d'un milieu de culture d'*Escherichia coli* V. Cette substance nommée colicine V inhibe la croissance d'une autre souche d'*E. coli* : *E. coli* φ (**Gratia, 1925**).

Bien que les bactériocines des bactéries lactiques puissent agir via différents mécanismes pour exercer un effet antibactérien, l'enveloppe cellulaire est généralement la cible (**Deegan et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009**).

L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne (**Barrena-Gonzalez et al., 1996 ; Martinez-Cuesta et al., 1997**).

Le mécanisme d'action se décompose en trois étapes : (i) adsorption de la bactériocine sur la membrane ; (ii) structuration du peptide et ancrage sur le récepteur dans la bicouche lipidique ; (iii) les bactériocines s'oligomériseraient pour former un pore permettant l'efflux de métabolites, aboutissant à la mort cellulaire (**Revol-Junelle et Cailliez-Grimal, 2008**).

On trouve des souches productrices de bactériocines chez tous les genres de bactéries lactiques. Le nombre de bactériocines détectées, si ce n'est caractérisées, n'a cessé d'augmenter au cours des dernières années (**Ennahar et al., 2000 ; Hechard et Sahl, 2002**). Plus de 500 bactériocines qui diffèrent de par leur structure et leur mécanisme d'action ont été identifiées (**Hammami et al., 2007**). Vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (**Albano et al., 2009**).

Les bactériocines présentent un potentiel non négligeable pour les industries de l'agro-alimentaire et de la santé (**Morrisset, 2011**). 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. Elles sont pour la plupart, inodores, insapides, mais surtout, non toxiques ce qui a mené à leur approbation par la **FDA** (Food and Drug Administration).

Des expérimentations *in vivo* sur des animaux de laboratoires ont montré l'efficacité de certaines bactériocines dans le traitement de certaines maladies fonctionnelles (**Grasemann et al., 2007 ; Kuipers et al., 2009**).

Des rapports sur l'utilisation thérapeutique des bactériocines comme la mersacidine, produite par *Bacillus sp.* souche HIL Y85, était active contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez les souris (**Kruszewska, 2004**).

L'injection intramammaire de la nisine et de la lysotaphine chez des vaches laitières atteintes de mammite, assure une guérison de 66% des cas d'infection à *Staphylococcus aureus*, 95% des cas à *Streptococcus agalactiae* et 100% des cas à *Streptococcus uberis* (**Sears et al., 1992**). De plus, la nisine et la lacticine 3147 sont utilisées comme agents antibactériens dans des produits de nettoyage et de protection des mamelles des vaches laitières pour lutter contre les mammites (**Cotter et al., 2005**).

En plus des bactériocines, d'autres substances antibactériennes d'origine non microbienne (végétaux, insectes) sont étudiées pour leur effet antibactérien. Diverses études *in vitro*, ont mis à l'évidence les effets antimicrobiens des métabolites d'origine végétale : huiles essentielles et flavonoïdes.

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et leurs constituants est l'une des activités biologiques les plus étudiées actuellement vu l'apparition et l'extension rapide du phénomène de résistance aux antimicrobiens classiques qui constitue un problème majeur de santé publique. De ce fait, il semble nécessaire de procéder à la recherche de nouveaux principes dans les produits naturels, utilisés traditionnellement de manière empirique, parmi lesquels les huiles essentielles (HE) (**Marroki et al., 2010**).

Les HE de *Myrtus communis L.* extraite par hydrodistillation a fait l'objet d'une étude à Mostaganem, dans le but d'évaluer leur activité antibactérienne sur les bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Proteus* et *Klebsiella sp.*) par la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats obtenus ont montré que ces HE présentent des propriétés inhibitrices significatives (**Hennia et al., 2010**).

Une étude menée à Tlemcen, l'Ouest de l'Algérie, dans le but d'évaluer l'effet antibactérien à l'égard de bactéries pathogènes ; *E. coli* et *S. aureus* ; de flavonoïdes extraits de plantes aromatiques et médicinales, le thym (*Thymus vulgaris*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*), des labiées reconnus depuis l'antiquité pour leurs vertus thérapeutiques. Les

résultats de la méthode de diffusion sur gélose ont révélé des zones d'inhibition considérables pour les deux souches pathogènes (**Zeghad et al., 2010**).

Un travail expérimental mené à Moustaganem, a porté sur l'étude de l'effet inhibiteur des extraits phénoliques de *Salvadora persica* (Siwak) récolté dans la région d'Arak à Tamanrasset, au sud de l'Algérie, sur la croissance de certaines bactéries responsables de caries dentaires. Les résultats ont démontré que les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* à savoir *Streptococcus mitis*, ainsi que des streptocoques fécaux du genre *Staphylococcus* dont *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* et les *Lactobacillus casei* ont été totalement inhibés (**Ait Chabane et al., 2010**).

Dans le but de mettre en évidence l'effet inhibiteur des bactéries lactiques, le pouvoir antagoniste de deux ferments lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgarius*) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* a été démontré par la méthode de diffusion sur milieu solide. Leurs interactions ont donné des résultats positifs définis par l'apparition de zones d'inhibition. Des tests supplémentaires ont été nécessaires pour connaître la nature exacte des agents inhibiteurs. Les résultats ont montré que les peptides antibactériens (bactériocines) présentent un spectre d'activité étroit envers l'espèce pathogène par rapport à l'acidité (**Tabak et al., 2010**).

Cependant, rares sont les travaux réalisés sur l'association des bactériocines aux antibiotiques. Pourtant 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 *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 et *E. coli* ATCC 35150 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 0,12 µg/ml à 0,03 µg/ml chez *E. coli* ATCC 35150.

D'autres travaux menés par **Tong et al. (2014)**, ont montré les effets synergiques vis-à-vis du pathogène *Enterococcus faecalis* obtenus en combinant la nisine avec la pénicilline ou le chloramphénicol.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, dont le but est d'essayer de contribuer à l'étude de l'effet combinatoire entre la céfoxitine et la paracaseicine A produite par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK 2005, sur la résistance aux β-lactamines de certaines souches de SARM.

Partie II

*Matériel
et
méthodes*

Ce travail a été réalisé au
laboratoire de recherche de
Microbiologie Appliquée, équipe
Interactions Microbiennes,
biofilms et probiotiques, ainsi
qu'au laboratoire 1 de
microbiologie du bloc 9, de
l'université A. Mira, Béjaia

Notre étude s'est étendue sur 3 mois de travail, une période allant du 12 mars jusqu'au 1^{er} juin 2017, au niveau du laboratoire de microbiologie 1 se situant au bloc 9, ainsi qu'au laboratoire de recherche de Microbiologie Appliquée (LMA). Tous les deux sis à l'université de Bejaïa, Targa Ouzemour.

I. Origine des souches utilisées

Une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* faisant partie de la collection microbienne du LMA, a été utilisée pour la production de la bactériocine connue sous le nom de la paracaseicine A. Cette souche a été identifiée par séquençage de l'ADNr 16S et spectrométrie de masse MALDI TOF (Matrix-associated Laser Description/Ionization Time of flight). Elle est conservée à -18°C dans un bouillon MRS à 20% de glycérol.

Une souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, a été utilisée dans cette étude comme souche cible.

En outre, 08 souches de *staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ont été utilisées, fournies par Dr Djoudi F. et faisant partie du LEM, prélevées à partir de liquides pathologiques humains. Ces dernières ont contribué à l'étude de la synergie entre la céfoxitine et la bactériocine « Paracaseicine A », en tant que souches cibles (tableau I).

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

N° de la souche	Type	Origine du prélèvement	Profil de résistance					CMI de FOX µg/ml
			FOX	OXA	TE	NF	NF	
594	SARM-HA	PUS	FOX	OXA	TE	NF	NF	8
936	SARM-CA	PUS	FOX	OXA	NF	DA	E	32
637	SARM-HA	PUS	FOX	OXA	CIP	NF	CLR	16
391	SARM-HA	OREILLE	FOX	OXA	TE	NF	NF	8
810	SARM-HA	INC	FOX	OXA	NF	TE	NF	-
433	SARM-CA	PUS	FOX	OXA	NF	NF	NF	16
298	SARM-HA	PUS	FOX	OXA	CIP	TE	NF	4
363	SARM-HA	LIQUIDE GASTRIQUE	FOX	OXA	TE	NF	NF	-

SARM-HA: SARM hospitalier ; SARM-CA: SARM communautaire ; FOX : Céfoxitine ; OXA : Oxacilline ; TE : Tétracycline ; NF : non fait ; INC : Inconnu ; CIP : Ciprofloxacine ; CLR : claretromycine ; E : Erythromycine ; DA : clindamycine.

II. Revivification de la souche *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

La revivification de la souche de *Lactobacillus* est réalisée avec 03 repiquages successifs sur bouillon MRS, jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance bactérienne. L'incubation est faite dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

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

Le travail réalisé par Dr Bendjeddou et *al.*, (2012), a permis de mettre en évidence une activité anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 dont est pourvue la souche de *Lactobacillus paracasei* utilisée dans cette étude. Cette activité est attribuée à une bactériocine appelée paracaseicine A produite par cette dernière.

Pour vérifier l'activité de la bactériocine, la méthode de diffusion sur gélose par la technique des puits a été réalisée. Ainsi, 200 ml de bouillon MRS sont inoculés par 3 ml d'une culture fraîche (24h/37°C) de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, ensuite, incubé dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, une croissance importante des cellules lactiques a été observée, traduite par l'aspect trouble du milieu. Par la suite l'élimination des lactobacilles par centrifugation a été réalisée à 10000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant récupéré (200 ml) a subi une concentration sous vide (20 fois concentré= 20 ml de concentré) en utilisant un évaporateur rotatif à 40°C (figure 1). Une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) a étéensemencée en surface à l'aide d'un écouvillon plongé dans une suspension bactérienne d'*E. coli* ATCC 25922 préalablement préparée à partir d'une culture fraîche de 24h de cette dernière (un inoculum de 10⁶ UFC/ml) et essoré en tournant sur les parois du tube pour éliminer l'excès de liquide et cela est important pour éviter une sur-inoculation de la boîte. Elle est laissée sécher 15 minutes à température ambiante, ensuite un puits de 6 mm de diamètre et de 4 mm de profondeur est creusé au milieu de la gélose à l'aide d'un embout (bleu) stérile et rempli avec 100 µl du surnageant concentré. La boîte a été laissée au réfrigérateur pendant 2h à 4°C pour permettre la diffusion totale du surnageant et inhiber la croissance de la souche cible. La lecture est faite après 24h d'incubation à 37°C, pour vérifier la présence d'une zone d'inhibition autour du puits afin d'affirmer l'activité antibactérienne du lactobacille à l'égard d'*E. coli* ATCC 25922.



Figure 1 : Evaporation sous vide du surnageant de la culture de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*

IV. Extraction de la paracaseicine A

A partir d'une culture fraîche de 24h de *Lactobacillus paracasei* ensemencé dans 10 ml de bouillon MRS et incubé à 37°C, 500 ml de bouillon MRS ont été inoculés à 2%, puis incubés à 37°C durant 24h. Par la suite une centrifugation (8000g/ 30 min à 4°C) a permis d'éliminer les cellules bactériennes. 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 semi-purification de la paracaseicine A produite par la souche de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* est réalisée grâce à la chromatographie en phase inverse C₁₈ (sep-pack).

IV.1. Réalisation de la chromatographie en phase inverse

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

IV.1.1. Préparation de la colonne

Cette procédure est entamée par la préparation d'une solution de TFA à 0,05% en ajoutant 1 ml de TFA concentré à 2 L d'eau distillée. La colonne est d'abord nettoyée avec 120 ml d'acétonitrile puis équilibrée avec 120 ml de la solution de TFA.

Par la suite, des solutions de 120 ml sont préparées, dans lesquelles les deux solvants sont mélangés suivant un gradient croissant et discontinu d'acétonitrile auquel on ajoute la solution de TFA à 0,05%. Les concentrations de l'acétonitrile dans les solutions sont comprises entre 10 et 40% (tableau II).

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

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

Avant le dépôt du surnageant sur la colonne de chromatographie (figure 2), il doit être dans les mêmes conditions d'équilibrage que la colonne. Pour cela, le surnageant concentré pourvu de l'activité antibactérienne est mélangé avec un volume équivalent de la solution de TFA dans l'eau à 0,05%.

Le surnageant une fois équilibré, est passé à travers la colonne à un débit de 2 ml/min. Ensuite, la colonne est lavée avec 200 ml de solution de TFA à 0,05% en utilisant le même débit.

L'élution est effectuée par 120 ml de solutions composées des deux solvants, ayant un gradient croissant et discontinu d'acétonitrile. La procédure se termine par le lavage de la colonne avec 120 ml d'acétonitrile.

A la fin, quatre fractions sont obtenues et seule la fraction obtenue avec 30% d'ACN (120 ml sont récupérés) a subi une concentration sous vide (10 fois concentré=12 ml de concentré) par l'usage de l'évaporateur rotatif pour éliminer les solvants et servir ensuite à réaliser les tests d'activité antibactérienne vis-à-vis des souches cibles.



Figure 2 : Installation de la colonne de chromatographie effectuée sur gel de silice C18 de type Discovery DSC-18

V. Repiquage des souches de SARM

Le repiquage des souches de SARM est effectué dans un bouillon BHI, suivi d'une incubation dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Par la suite, elles ont été repiquées sur la gélose PCA et incubées pendant 24h à 37°C. Ainsi ces dernières serviront à préparer les suspensions bactériennes nécessaires pour les microdilutions.

VI. Mise en évidence de l'activité antibactérienne *in vitro* de la fraction à 30% vis-à-vis des souches cibles

Les deux souches de SARM utilisées sont : SARM 810 et SARM 391 ainsi que la souche de référence d'*E. coli* ATCC 25922. La mise en évidence de cette activité antagoniste à l'égard de ces bactéries est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, la technique des puits, la même méthode que celle réalisée avec le surnageant concentré seul pour *E. coli* ATCC 25922 au début de notre étude. Cependant, dans ce cas deux puits de 6 mm de diamètre et 4 mm de profondeur ont été creusés, l'un pour contenir 100 µl du surnageant concentré et l'autre 100 µl de la fraction 30%, ainsi les différents diamètres des

zones d'inhibition autour des puits ont pu être comparés et mesurés à l'aide d'un pied à coulisse après incubation des boîtes à 37°C/24h.

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

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 prapaseicine A et la céfoxitine à l'égard des SARM, est réalisé par l'usage de cette fraction.

Le test des microdilutions permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'antibiotique (**Tong et al., 2014**). Pour réaliser ce test, 3 microplaques stériles de 96 cupules ont été utilisées. Ces dernières se composent de 12 colonnes et 8 lignes chacune. Pour chaque souche étudiée, 4 colonnes de 8 cupules ont été utilisées. Dans la première cupule de chaque colonne, 100 µl des solutions à tester sont déposés comme suit:

- Première colonne : fraction 30%
- Deuxième colonne : céfoxitine (1^{ère} cupule : 64µg/ml)
- Troisième colonne : le mélange céfoxitine + fraction 30%
- Quatrième colonne : bouillon MH stérile (témoin négatif)

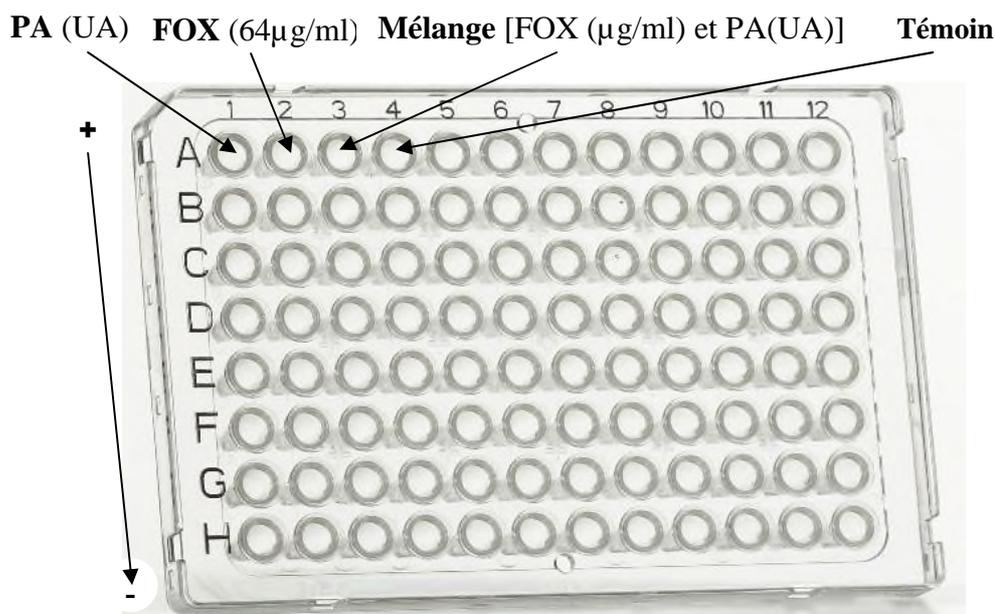


Figure 3 : Technique des microdilutions en microplaque

Source : img.medicalexpo.fr

Les dilutions en cascade à ½ commencent à partir de la première cupule de chaque colonne jusqu'à la dernière (la 8^{ème} cupule), et cela en ajoutant à chaque fois 100 µl du bouillon Mueller Hinton (MHB) aux différentes solutions contenues dans les trois premières colonnes, en veillant à bien mélanger à l'aide de la micropipette, quant aux cupules de la quatrième colonne, elles n'ont contenu que 100 µl du MHB. Ce procédé est suivi par l'inoculation de chaque cupule de toutes les colonnes avec 50 µl de suspension bactérienne à 10⁶ UFC/ml préparée à partir de chaque souche de SARM. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats permettra de révéler la résistance de chaque souche de SARM, à l'égard de l'antibiotique ou à la bactériocine, par la présence d'un dépôt bactérien (croissance de la souche) au fond des cupules.

La CMI est définie comme étant la concentration la plus basse d'un agent antimicrobien dans laquelle la croissance bactérienne est complètement inhibée (**Andrews, 2001**).

Les CMI dans la microplaque diminuent en suivant le sens des dilutions. Si un dépôt de cellules bactériennes est détecté au fond des cupules contenant la céfoxitine et celles de la paracaseicine A, et parallèlement l'absence de croissance de la bactérie dans les cupules contenant le mélange des deux antibactériens à la même CMI ou à des CMI plus faibles que celles des deux antibactériens séparés, dans ce cas là, on pourra parler de synergie entre l'antibiotique et la bactériocine.

D'après **Naghmouchi et al. (2013)**, la synergie entre la bactériocine et l'antibiotique peut être évaluée en calculant un facteur appelé « Index de concentration inhibitrice fractionnée » ou « FICI ». Ce facteur est calculé par l'équation suivante :

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

Selon **Naghmouchi et al. (2013)**, la synergie est considérée comme positive (présence de synergie) si $\text{FICI} \leq 1$ et négative (absence de synergie) si $\text{FICI} > 1$.

Partie III

*Résultats
et
discussion*

I. Vérification de l'activité antagoniste de *Lb. paracasei* à l'égard d'*E.coli* ATCC 25922

Le test d'antagonisme du surnageant concentré natif (PH : 4.5) de la culture de *Lb. paracasei* a confirmé le pouvoir antibactérien de cette dernière vis-à-vis de la souche d'*E.coli* ATCC 25922, par une zone d'inhibition de 35 mm de diamètre en incluant le diamètre du puits (figure 4).

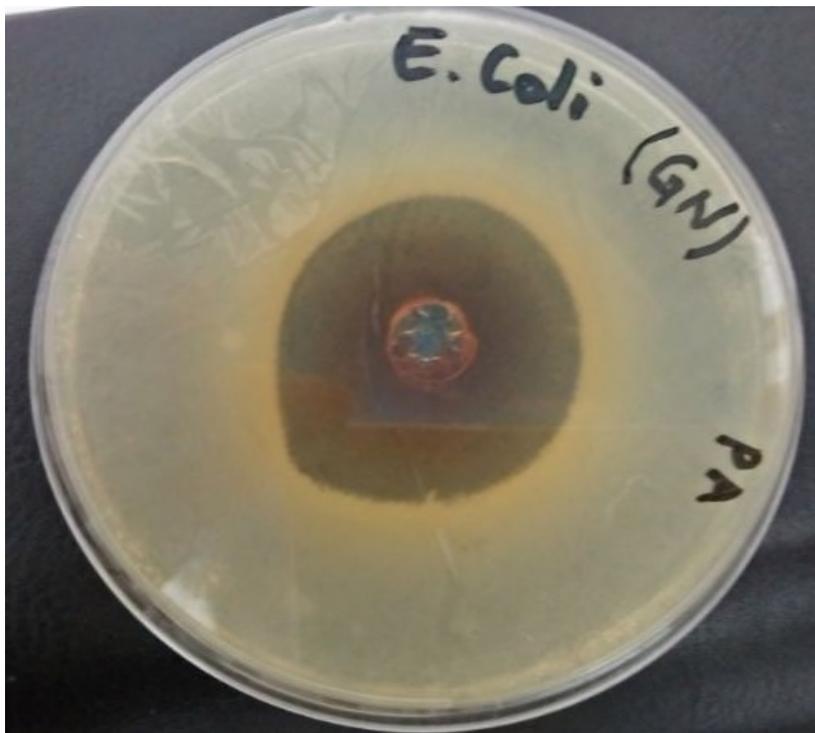


Figure 4 : Activité antibactérienne de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard d'*E.coli* ATCC 25922 révélée par le test des puits.

L'inhibition des bactéries indésirables ou pathogènes par les bactéries lactiques peut se faire de différentes façons (**Robin et Rouchy, 2001**) : la production de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

II. Purification partielle de la paracaseicine A

La chromatographie en phase inverse réalisée pour la semi-purification de la bactériocine, a permis d'obtenir quatre fractions aux différentes concentrations de l'ACN : 10% , 20%, 30% et 40% d'acétonitrile. Seule la fraction à 30% a été retenue pour la réalisation des tests d'activité antibactérienne après avoir subi une évaporation sous vide pour éliminer les solvants organiques.

III. Test d'activité antibactérienne de la paracaseicine A à l'égard d'*E.coli* ATCC 25922 et SARM

Les résultats de ce test ont démontré l'activité antibactérienne de la bactériocine semi-purifiée (la fraction 30% avec un PH :4.8) à l'égard des souches testées, traduite par la présence de zones d'inhibition autour des puits contenant la paracaseicine A semi purifiée dont les diamètres diffèrent d'une souche à une autre (en incluant le diamètre du puits) : 19 mm de diamètre pour la souche d'*E.coli* ATCC 25922, 17 mm de diamètre pour SARM 810 et 11 mm de diamètre pour SARM 391.

En comparaison avec les diamètres des zones d'inhibition autour des puits contenant le surnageant natif (en incluant le diamètre du puits) qui sont de : 40 mm de diamètre pour *E. coli*, de 31 mm pour SARM 810 et de 27,5 mm pour SARM 391, on a constaté que les zones d'inhibition autour des puits de la fraction 30% sont plus petites chez toutes les souches testées, et cela est dû à l'élimination des autres métabolites antimicrobiens produits par *Lactobacillus paracasei* après la semi-purification (fig. 5, 6 et 7).

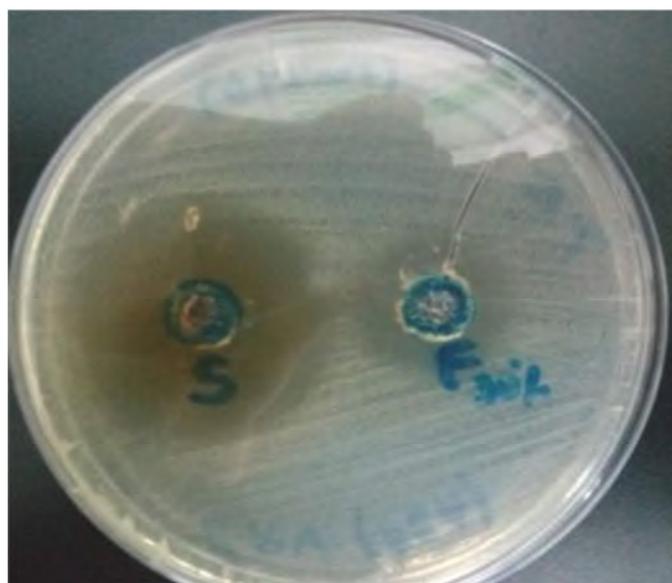


Figure 5 : Activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard d'*E.coli* ATCC 25922 révélée par le test des puits.

S : surnageant concentré

F 30% : fraction 30%



Figure 6 : Activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard de SARM 391 révélée par le test des puits.

S : surnageant concentré

F30% : la fraction 30%

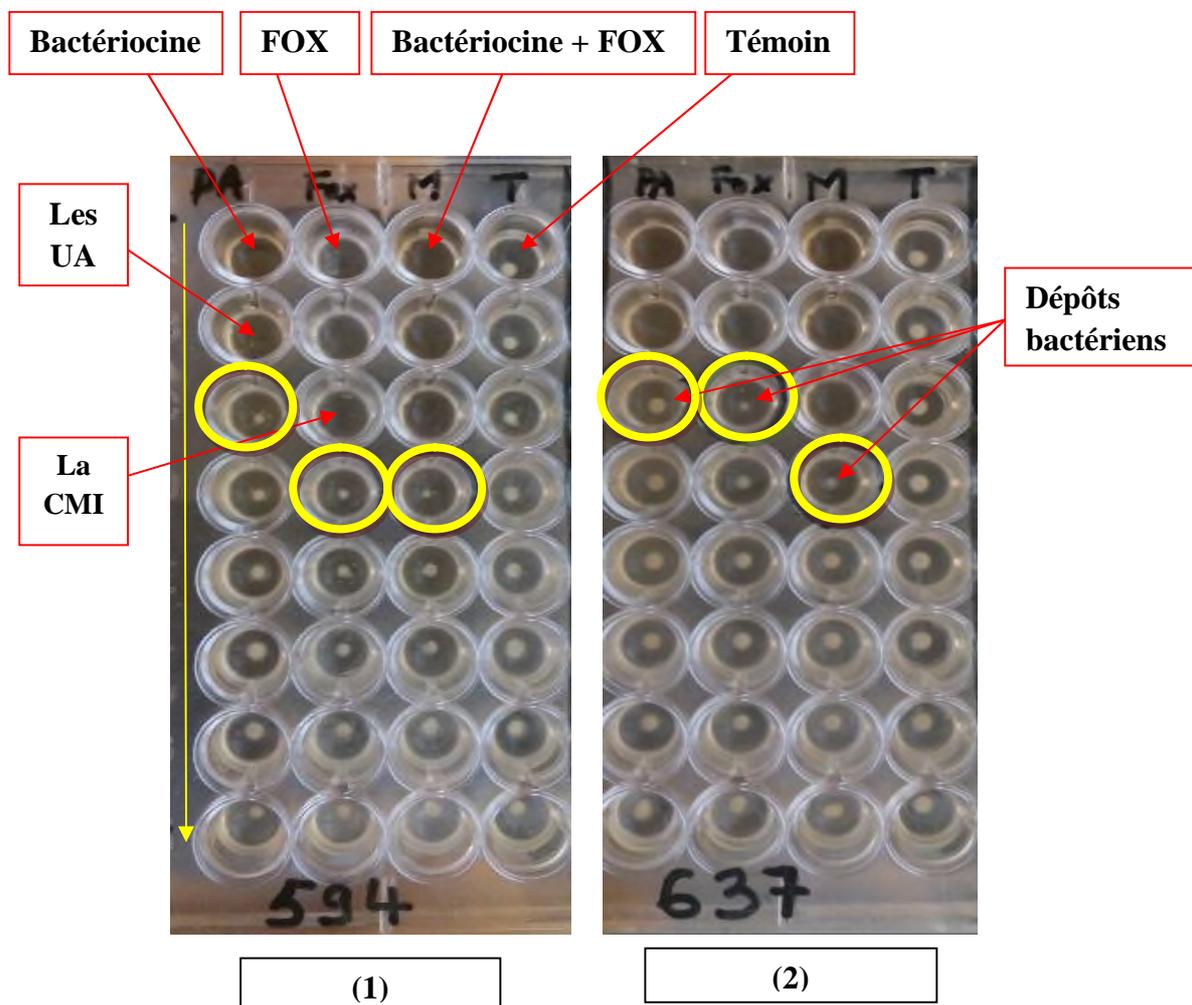


Figure 7 : Activité antibactérienne de la fraction 30% à l'égard de SARM 810 révélée par le test des puits.

La fraction à 30% d'acétonitrile ne contient qu'une très faible concentration en acides lactiques qui ne suffit pas pour attribuer l'effet antibactérien à ces derniers, ce qui signifie que cette fraction contient d'autres substances responsables 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 A (**Bendjeddou, 2013**).

IV. Test de synergie entre la paracaseicine A et la céfoxitine

L'effet synergique de la combinaison [Paracaseicine A + la céfoxitine] a été évalué à l'aide de la technique des microdilutions sur microplaque. Cette synergie a été observée chez toutes les souches de SARM testées : SARM 936, SARM 637, SARM 391, SARM 433, SARM 810, SARM 298, SARM 363 sauf la souche SARM 594. Les résultats sont illustrés dans les figures 8, 9, 10 et 11 et rapportés sur le tableau IV :



Figures 8 : Test de synergie de la céfoxitine et la paracaseicine A chez les souches : SARM 594 (1), SARM 637 (2).



Le sens des dilutions

PA : Paracaseicine A ; **FOX** : Céfoxitine ; **M** : Mélange (PA+FOX) ; **T** : Témoin

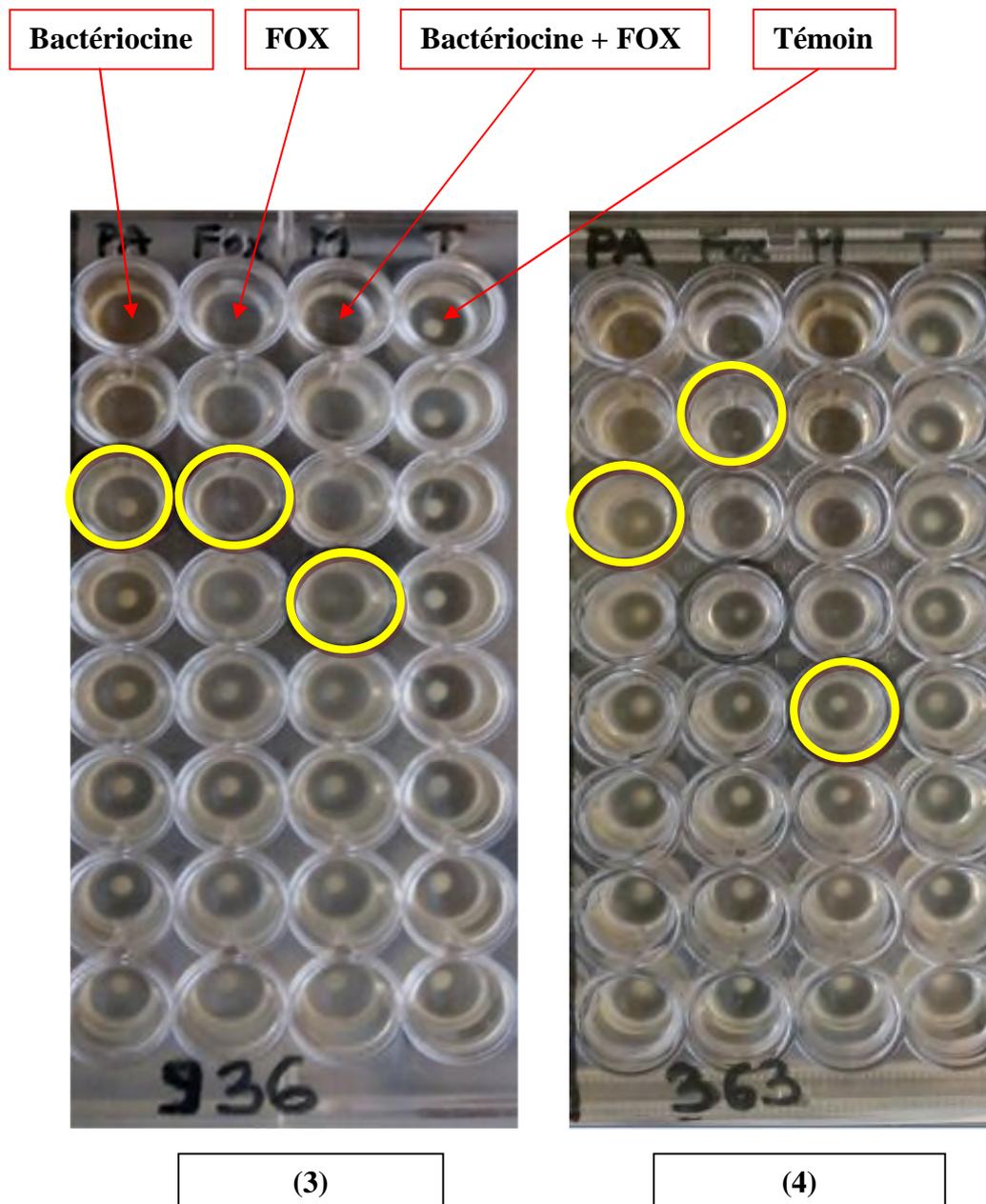


Figure 9 : Test de synergie de la céfoxitine et la bactériocine chez les souches de SARM : SARM 936 (3), SARM 363 (4).

PA : Paracaseicine A ; **FOX** : Céfoxitine ; **M** : Mélange (PA+FOX) ; **T** : Témoin

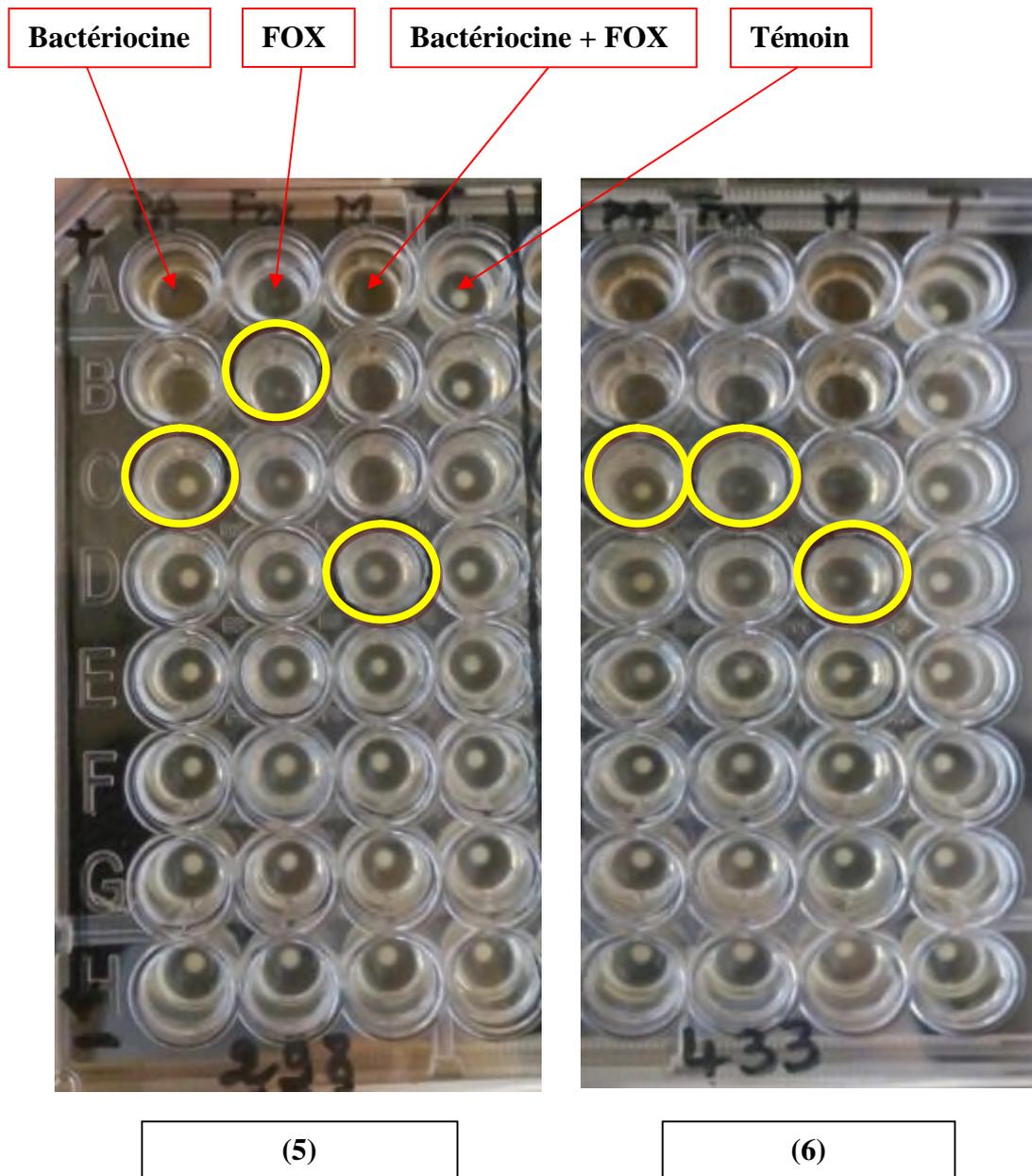


Figure 10 : Test de synergie de la combinaison paracaseicine A et céfoxitine chez les souches : SARM 298 (5) et SARM 433 (6).

PA : Paracaseicine A ; **FOX :** Céfoxitine ; **M :** Mélange (PA+FOX) ; **T :** Témoin

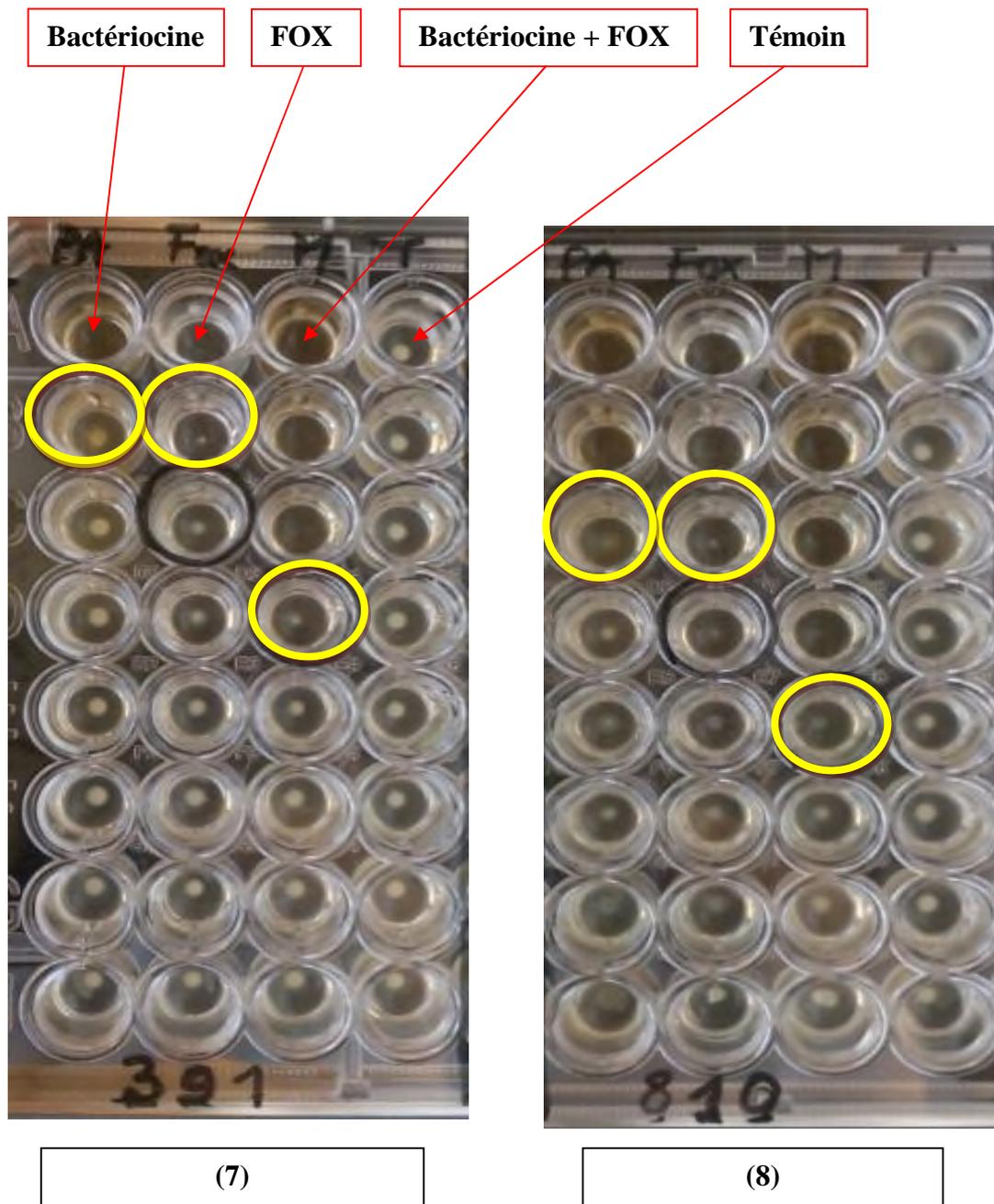


Figure 11 : Test de synergie de la céfoxitine et la paracaseicine A chez les souches de SARM : SARM 391 (7) et SARM 810 (8).

PA : Paracaseicine A ; **FOX** : Céfoxitine ; **M** : Mélange (PA+FOX) ; **T** : Témoin

Tableau IV : Résultats de la synergie de la paracaseïcine A (PA) en combinaison avec la céfoxitine (FOX).

N° de la souche de SARM	CMI de la FOX seule (µg/ml)	CMI de la PA seule (UA)	CMI de la FOX dans le mélange (µg/ml)	CMI de la PA dans le mélange (UA)	FICI	Le facteur de réduction	La synergie
936	16	4	8	0,08	0,52	2	+
363	32	4	4	0,04	0,14	8	+
594	8	4	8	0,08	1,02	1	-
637	16	4	8	0,08	0,52	2	+
298	32	4	8	0,04	0,26	4	+
433	16	4	8	0,04	0,51	2	+
391	32	2	8	0,08	0,29	4	+
810	16	4	4	0,04	0,26	4	+

La synergie est considérée comme positive (présence de synergie) si $FICI \leq 1$ et négative (absence de synergie) si $FICI > 1$ (Naghmouchi *et al.*, 2013).

Selon le CA-SFM/EUCAST, dans les recommandations de 2016 (version 2 de 2015), des souches de *S. aureus* caractérisés par une CMI à la céfoxitine >4 mg/l est résistant à la méthicilline, principalement du fait de la présence d'un gène *mec* additionnel (*mec A*, *mec C*).

Le tableau IV rapporte les résultats obtenus des microdilutions indiquant non seulement l'activité antibactérienne de la paracaseïcine A contre les souches de SARM mais aussi l'effet combinatoire entre la bactériocine et la céfoxitine chez toutes les souches, et cela est révélé par la réduction ; plus ou moins importante ; de la CMI de la FOX envers chaque souche testée. En effet, cette réduction est différente d'une souche à une autre.

Une des souches testées, SARM 363, s'est distinguée des autres par un taux maximal de réduction nettement important, puisque la combinaison entre la paracaseïcine A et la céfoxitine a permis de réduire la CMI de la FOX envers cette souche de 8 fois, passant ainsi d'une CMI de 32 µg/ml à 4 µg/ml, soulignant de ce fait la synergie la plus forte.

Trois autres souches, SARM 298, SARM 391 et SARM 810, présentent un taux de réduction tout aussi considérable qui est de 4 fois. De ce fait, la CMI de la FOX seule vis-à-vis de ces souches passe de 32 µg/ml à 8 µg/ml chez SARM 298 et SARM 391 et de 16 µg/ml à 4 µg/ml chez SARM 810, après l'avoir associé à la paracaseïne A.

Cependant, une plus faible synergie est notée chez trois souches : SARM 936, SARM 637 et SARM 433. Ainsi, l'effet combinatoire entre les deux antibactériens a réduit de 2 fois les CMI de la FOX pour toutes ces souches, de 16 µg/ml à 8 µg/ml. Néanmoins, une absence totale de synergie a été observée chez une seule souche, SARM 594, dont la CMI de la FOX n'étant pas réduite, est restée à une valeur de 8 µg/ml

Les conséquences collectives et individuelles de la résistance bactérienne sont graves, car elle représente une cause croissante d'échecs thérapeutiques (**Lonks, 2004**). Actuellement ; des mécanismes de résistances 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 (**Boerling et White, 2006 ; Harbottle et al., 2006**).

Jusqu'à aujourd'hui, l'approche habituelle pour faire face à cette crise est de développer de nouveaux antibiotiques. Toutefois, les nouveaux antibiotiques sont limités, et les bactéries pathogènes vont progressivement développer des résistances à ces nouveaux antibiotiques (**Palmer et Kishony, 2013**). Basé sur la tendance inévitable vers la résistance bactérienne, il est nécessaire d'explorer de nouvelles stratégies innovatrices de traitement pour la lutte et l'élimination effectives des bactéries pathogènes multirésistantes (**Tong et al., 2014**).

Selon les résultats des études antérieures, les peptides antimicrobiens (PAM) ou bactériocines représentent une alternative prometteuse pour le traitement de maladies infectieuses (**Wang et al., 2013 ; Hammami et al., 2013**).

Les bactériocines ont été étudiées pour le développement de nouveaux traitements antibactériens et cela pour leur fort potentiel antibactérien et leur faible résistance (**Jenssen et al., 2006 ; Hadley et al., 2010**). Bien que les bactériocines représentent potentiellement une nouvelle source d'antibactériens pour le traitement de différentes infections bactériennes, les antibiotiques conventionnels restent la première ressource de thérapie antibactérienne et ne peuvent être totalement remplacés. Par conséquent, combiner des antibiotiques conventionnels avec les bactériocines peut prolonger l'espérance de vie de nombreux antibiotiques (**Severina et al., 1998**).

Notre étude s'inscrit dans ce même contexte. Les composés antibactériens utilisés dans ce travail est la céfoxitine et la paracaseicine A.

Les résultats de l'association de la céfoxitine et la paracaseicine A semi-purifiée, ont montré que cette combinaison a abouti à une synergie entre les deux antibactériens sur la quasi-totalité des souches de SARM testées. Cet effet synergique a permis de réduire la CMI

de la céfoxitine. La plus forte synergie est révélée chez SARM 363 avec un facteur de réduction égal à 08 fois, une synergie moins forte est observée chez SARM 298, SARM 391 et SARM 810 avec une réduction de 4 fois, cependant une synergie plus faible est notée chez SARM 936, SARM 637 et SARM 433 où la CMI de la FOX est seulement réduite de 02 fois.

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 électrostatique (**Che et al., 1997**). C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité. Puis elle est suivi par l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique pour la formation de pores, ce qui conduit à la mort cellulaire (**Huang et al., 2006**). Toutefois, certaines bactériocines agissent sur leurs bactéries cibles sans formation de pores. En effet, ces bactériocine se fixent sur le lipide II et provoque 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 certaines bactériocines, il s'agit de 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 synthèse de la paroi cellulaire (**Wiedemann et al., 2006**).

Par conséquent, la synergie entre la céfoxitine et la paracaseicine A pourrait être expliquée par deux mécanismes :

- La formation de pores aboutit 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 d'avantage l'action de la céfoxitine par inhibition de la synthèse de la paroi.

Conclusion
et
Perspectives



Notre travail avait pour objectif l'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne de la paracaseicine A produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* et de son effet synergique en association avec la céfoxitine à l'égard des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

L'activité antimicrobienne de la bactériocine a été déterminée par la méthode de diffusion sur milieu solide. La CMI de la céfoxitine (FOX) seule ou en combinaison avec le peptide antimicrobien a été déterminée par la méthode des microdilutions sur microplaque.

Lorsque la céfoxitine a été combinée avec la paracaseicine A, la CMI a diminué de manière significative chez toutes les souches de SARM testées sauf chez SARM 594, ce qui indique une synergie entre ces deux antibactériens. Cette réduction est variable d'une souche à une autre voire absente. La plus forte synergie est observée chez SARM 363 où la CMI de la FOX a été réduite de 08 fois passant de 32 µg/ml à 4 µg/ml, tandis qu'une absence totale de cette synergie est notée chez SARM 594 dont la CMI de la FOX est restée à 8 µg/ml même après l'avoir associé à la paracaseicine A. Une autre réduction considérable de la CMI a été observée chez SARM 298, SARM 391 et SARM 810 où elle a diminué de 04 fois, de 32 µg/ml à 8 µg/ml chez SARM 298 et SARM 391 et de 16 µg/ml à 4 µg/ml chez SARM 810. Par ailleurs, les 03 autres souches de SARM restantes ont souligné la plus faible synergie avec un facteur de réduction égale à 02 fois. De ce fait, les CMI ont baissé de 16 µg/ml à 8 µg/ml.

Ces résultats plaident en faveur de l'utilisation de la paracaseicine A dans le traitement des infections dues aux BMR, à savoir *Staphylococcus aureus*. En perspectives, cette étude reste préliminaire et mérite d'être exploitée et complétée par d'autres travaux relatifs à :

- L'utilisation d'une bactériocine pure pour confirmer les résultats obtenus.
- L'étude élargie sur l'activité antimicrobienne de *Lb. paracasei* envers d'autres bactéries à Gram positif et à Gram négatif responsables d'infections noscomiales.
- Réalisation de tests *in vivo* pour vérifier l'efficacité de la synergie.

*Références
bibliographiques*





Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Carneiro, L., Magalhaes, R. (2009). Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Lactococcus acidilactici* as a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control*. 20. 764-770

Ait chabanet, O., Boudreoua, K., Ait saada, D. et Selselet Attou, G. (2010). Effet antimicrobien des extraits phénoliques de *Salvadora persica* (Siwak) sur la croissance de certains germes responsables de caries dentaires. Département d'Agronomie Université de Mostaganem, département de Biotechnologie Université de Mostaganem, département de Biologie Université de Mostaganem.

An Diep, B.S., Gill, R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Felice, L., Jessica, L., Heather, A.C., Mongodin, E.F., Sensabaugh, G.F., Perdreau-Remington, F. (2006) : Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Articles* 367, 731–739.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* ; 48 suppl 15-16.

Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, 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 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int.J.Food Microbiol.* 87 ,63-73



Barbara, J.H., Hjo'rdis, H., Gunnsteinn, H., Henrik, W., Freyja, V., Kit, B., Sigfus, K., Karl, G. K. et Olafur, G. 2010. Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Iceland from 2000 to 2008: a Challenge to Current Guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 4221–4227

Benabbou T.A. (2012). Antibiorésistance des bactéries lactiques isolée de produits artisanaux algériens. *Mémoire Magistère*

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., Strocher, P., Sadoun D. (2012). Characterisation and purification of bactériocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* BMK 2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. *World J. Microbiol Biotechnol.* 28 , 1543-1552.

Betsy, C. H., Lilly, C. M., Melinda, C. M., Diane, S.L., Ryan, E. G., Susan, B.V., Cindy D. L., Robert, S. D. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children With No Identified Predisposing Risk. *American Medical Association*. 593-598.

Belguesmia, Y., naghmouchi, K., Chihib, N. E. and Drider, E. (2011). Class IIa bacteriocin: current knowledge and perspectives. In: Dridder, D. and Rebuffat S., (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: from genes to applications. Springer Verlag*. Nantes, France. pp 1-41.

Boerling, 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.

Bukharie, HA., Abdelhadi, MS., Saeed, IA et al. (2001). Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as an community pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 40:1-4.



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

Carle, S. (2009). la résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! le parrainage des antimicrobiens .*vision 2010, pharmactuel* .42(2).

Casewell, M.W. (1998). The nose: An underestimated source of *Staphylococcus aureus* causing wound infection. *Journal of Hospital Infection* 40.

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
Recommandations de 2016 version 2.0 de juillet 2015.

Che, 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* serotype 2 in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agent* .34(2) ,181-2.

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

Commission du Codex Alimentarius. (2008). Trente et unième session, Genève (Suisse), 30 juin-5 juillet 2008. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Rapport de la première session du groupe intergouvernemental spécial du Codex sur la résistance aux antimicrobiens.27-48.

Corpet, D.E. (1988). Antibiotic resistance from food . *New Eng J.Med.* 318, 1206-1207

Cotter, P.D., Hill, C., et Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nat Rev Microbiol.* 3.



Deegan, L. H., Cotter, P.D. and Hill, C. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*; 16: 1058-1071.

Deverriere, B.V.M, (2007).Reproduction expérimentale de mammites à *Staphylococcus aureus* chez la brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires. *Thèse de doctorat en médecine Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse(France)*.

De Vuyst, L. et Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In Bacteriocins of lactic acid bacteria. *E.J.Vandamme. Blackie Academic and Professional*. 91-142.

Dortu, C. et Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol Agron Soc Environ* ; 13:143-154.

Dietrich, D.W., Auld, D. B et Mermel, L. A. (2004) . Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Southern New England Children. *Official journal of the American Academy of Pediatrics* 113, 347-352.

Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M. et al. (2002). Community- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*; 35: 819-24.

Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.E., Tristan, A. et Vandenesch, F. (2010) . Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. *Med Sci (Paris)*. 26, 943–949.



Ejsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurbeg, M.B., Nes, I.F. (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* .64.

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



Flemminge, K., Ackermann, G. (2007). Prevalence of Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* in Stool of Patients with Nosocomial Diarrhea Infection .

Frank, R.D., Michael, O., Barry, N.K., Henry, F.C. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Seminars* .375,1558-1566



Gratia, A (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 93, 1040-1042.



Hadley, E. B., Hancock R. E. (2010). Strategies for the discovery and advancement of novel cationic antimicrobial peptides. *Curr Top Med Chem*; 10:1872-1881.

Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C. et Fliss, I., (2007). 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). Genetic of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol*; 17: 111-124.

Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith J. L., Hillman J. D., Zachariah, C., Kuispers, 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.

Hassan, H., et Shorman, M. (2011).Evaluation of the BD Gene Ohm MRSA and VanRAssays as a Rapid Screening Tool for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. a Tertiary Hospital in Saudi Arabia . *International Journal of Microbiology*. 1-6.

Hassan, M., Kjos, I.F., NES, D.B. et Lotfipour, F. (2012). Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance. *J Appl Microbiol*. 113, 723-736

Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W. et Tagg, J. R. (2007).The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: *Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer Verlag. Berlin Germany.* 45-92.

Hennia, A., Brada, M., Nemiche, S. (2010). Effets des huiles essentielles extraites de *Myrtus communis* L. de Chlef sur quelques souches bactériennes pathogènes. Département de Biotechnologie, Faculté des Sciences exactes et des Sciences de la nature et de la vie, Université de Mostaganem.

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

Holtfreter S., Grumann D., Schmudde M., Nguyen H. T. T., Eichler P., Strommenger D., Kopron K., Kolata J., Giedrys-Kalemba K., and Broker B., (2007) : Clonal Distribution of Superantigen Genes in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 45, 2669–2680.

Holmes, A., Edwards, G. F., Girvan, E. K., Hannant, W., Danial, J., Fitzgerald, J. R. et Templeton, K. E. (2010). Comparison of Two Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat

Methods and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Differentiating Highly Clonal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 48, 3600–3607

Ho P. L., Cheung, C. et Mak G. C. (2007). Molecular epidemiology and house hold transmission of community-associated méthicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 57(2) ,145-51.

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



Ito, T., Okuma, K., Ma, X. X., et al. (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* ; 6 : 41-52.

International Working Group on the classification of Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG-SSC) (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother*; 53: 4961-7.



Jack , R.W., Tagg, J.R. et Ray, B. (1995). Bactériocins of Gram Positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* 59(2) ,171-200.

Jenssen, H., Hamill P., Hancock R.E. (2006). Peptide antimicrobial agent. *Clin Microbiol Rev*; 19: 491-511.



Keiko, O., Kozue, I., John, D.T., Warren, B.G., Jan, M.B., Frances, G. O'B., Geoffrey W. C., John, W. P., Fred, C.T., Maria, K., Chuntima, T., Teruyo, I. et Keiichi, H. (2002). Dissemination of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 4289–4294

Kikuchi, K. (2003). Genetic basis of neonatal methicillin-resistant *Staphylococcus*. *Pediatrics International* .45, 223–229

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

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. Agent Chemother.* 43(6), 1549-55

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

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 1225-40.



Larsen, A.R., Skov, R.L., Jarlier, V. et Henriksen, A.S. (2008). Epidemiological differences between the UK and Ireland versus France in *Staphylococcus aureus* isolates resistant to fusidic acid from community-acquired skin and soft tissue infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61, 589–594

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

Li, M., Cheung, G.Y.C., Hu, J., Wang, D., Joo, H.S., DeLeo, F.R., et Otto, M. (2002) : Comparative Analysis of Virulence and Toxin Expression of Global Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Major article*, 1978-1999.



Maghrous, 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.

Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. and Mandell, D. B. (2009). Principles and practice of infectious diseases. Sixième édition, *Elsevier, Churchill Livingstone editors*, USA. Edition en ligne: <http://www.ppidon-line.com>

Marroki Bousmaha, L., Boti, J. B., Tomi, F. et Casanova J. (2010). Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* de la région de Tlemcen sur des germes d'origine hospitalière. Université Djilali Liabès, Faculté des Sciences, Sidi Bel-Abbes.

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

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

Morisset, D. (2011). La mésentéricine Y105, une défense bactérienne naturelle. Edition *Gallimard* ; p. 1-73.

Muylaert, A. et Mainil, J.G. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : Les mécanismes et leur contagiosité. *Ann. Med. Vét.* 156 , 109-123.



Naghmouchi K., Baah J., Hober D., Jouy E., Rubrecht C., Santé F. et Drider DJ. (2013). Synergistic Effet between Colistin and bactériocins in Controlling Gram-Négative Pathogens and Thier Potencial To Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells. *Antimicrob.Agent Chemother* .

Nazaretha., Goncalves-Pereiraa , J., Tavaresc, A ., Miragaic, M., Lencasterc, H., Silvestrea, J., Freitas, P., Goncalves, E., Martinsb, F., Mendesa, V., Tapadinhasa, C., Póvoaa, P. (2012) . Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Portugal. *Rev Port Pneumol.* 18, 33-38

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., et Nes, I.F. (1997) : A novel lactococcal bactériocin Whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol.*174, 5686-92



Oliveira, DC., Tomasz, A., Lencastre, H. (2002). Secrets of success of a human pathogen : molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis.* 2, 180-9.



Palmer, A. C., Kishony, R. (2013).Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Genet*; 14: 243-248.

Peles, F., Wagner, M., Varga, L., et al (2007).Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*

Q

Quincampoix, J.C. et Mainardi, J.L. (2001). Mécanisme de résistance des Gram Positif. *Serv.Microbiol.Clin.* 6756(1) ,00114-1



Raddey, K.V., Aranha, C., Gupta S.M. et Yedery, R.D (2004) . Evaluation of Antimicrobial Peptide Nisin as a Safe Vaginal Contraceptive Agent in Rabbit : *In vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction.*128, 117-126.

Report to the commissioner of the food and Drug Administration by the FDA Task Force (1972). The use of antibiotics in animal feeds .*Rochville ,Maryland :USA Government Printing.*

Revol-Junelle, A.M., Cailliez-Grimal, C. (2008). INPL Le site d'action des bactériocines de la sous-classe Iia est la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif. *Thèse doctorat.*

Robin, T. et Rouchy, A. (2001). Les probiotiques CEDN. *Nutrithérapie Info* ; 1-4.



Simone, M. S., Colin, S., Richard, A. V., Jennifer, K.J., Min, Z., Jon, P. F.(2009): Colonization Sites of USA300 Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Residents of Extended Care Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 30(4), 313-318.

Smytha, D. S., Wongb, A. et Robinsona, D. A (2011). Cross-species spread of SCCmec IV subtypes in staphylococci. *Infect Genet.* 11, 446-453

Stephanie, A. F., Jane, G., Alexis, E., William, S. et Gregory, A. (2008). Prevalence of and Risk Factors for Community-Acquired Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* in Children Seen In Practice-Based Research Network Colonization

Steven, Y. C. T., Rachael, A. L., Emma, J. B., Allen, C. C., Deborah, C. H., Malcolm, I. M., Philip M. G., Bart, J. C. et Craig, S. B. (2012). Clinical Correlates of Panton-Valentine Leukocidin (PVL), PVL Isoforms, and Clonal Complex in the *Staphylococcus aureus* Population of Northern Australia. *Major articule*.760-769

Susan, B.V. et Robert, S.D. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton–Valentine leukocidin. *Section of Infectious Diseases*.3–9



Tabak, S. et Benseltane A. (2010). L'activité antagoniste de deux ferments lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgarius*) vis-à-vis de la souche pathogène *Staphylococcus aureus*. Laboratory of Food and Industrial Microbiology, Departement of Biology, Faculty of Science, University f Oran.

Takeushi, F., Katayama, Y., Ito, T. et al. (2003). Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*; 185: 2711-22.

Teale, C.J. (2002).Antimicrobial resistant and the food chain. *J Appl Microbiol*.29, 85-89

Todorov, S. D. (2011). Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria. *Food Control*.21, 1011-1021.

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): 1-12.

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Baba, T., et al. (2010). Staphylococcal cassette chromosome *mec*-like element in *Macrocooccus caseolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 54: 1469-75.



Wesley E. K., Karl H. S and Rodney F. S. (1976) : Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp.nov. and Its Subspecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 26. 22-37.

Wiedmann, I., Bottiger, T., Boneli, 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.



Yves G., Bertrand I., Philippe V., Jean-Christophe, F., Gerard, L., Michèle, B., François V., Yves P., Nicole B., Daniel F., Jerome E : Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Mechanisms of disease*. 753-759.



Zeghad, N., Madi, A., Merghem, R. (2010). Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne des substances bioactives issues de plantes médicinales de l'est algérien. Laboratoire de développement et de valorisation des ressources phylogénétiques. Faculté des Sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri de Constantine.

Annexe

Composition des Milieux de culture utilisés

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

Composition	Quantité g/l	Pays	Laboratoire
Peptone	5	Algérie	Institut pasteur d'Alger
chlorure de sodium	5		
Extrait de viande	10		
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.			

Tableau N°II : Bouillon MRS (PH = 6,5)

Composition	Quantité g/l	Pays	Laboratoire
Polypeptone	10	Italie	Liofilchem
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		
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.			

Tableau N°III : Bouillon Muller Hinton (PH = 7,3)

Composition	Quantité g/l	Pays	Laboratoire
Extrait de viande	3	Algérie	Institut pasteur d'Alger
Hydrolysant de caséine	17,3		
Amidon	1,5		
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.			

Tableau N°IV : Bouillon Cœur Cerveille (PH =7,4)

Composition	Quantité g/l	Pays	Laboratoire
Extrait cœur-cerveille	17,5	Europe	Biokar
Peptone pancréatique	10,0		
Chlorure de sodium	5,0		
Phosphate disodique	2,5		
Glucose	2,0		
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.			

Tableau N°V: Gélose PCA (Plate Count Agar) (PH = 6,9)

Composition	Quantité g/l	Pays	Laboratoire
Tryptone	6	Europe	Biokar
Extrait de levure	3		
Glucose	1		
Agar	15		
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.			

Tableau N°V: Gélose Mueller Hinto (PH = 7.3)

Composition	Quantité g/l	Pays	Laboratoire
Extrait de viande	6	Europe	Biokar
Hydrolysant de caséine	3		
Amidon	1		
Agar	15		
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.			

Eau physiologique :

Eau distillée.....1000 ml

Chlorure de sodium9 g

PH = 7 et stériliser à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

Résumé

Objectif : Vérification de l'effet antagoniste de la paracaseicine A produite par *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* et l'évaluation de son effet synergique en combinaison avec la céfoxitine à l'encontre de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

Méthode et résultats : Dans le but de réaliser cette étude, une souche de *Lactobacillus paracasei* productrice de la paracaseicine A et 8 souches de SARM ont été utilisées. L'activité antibactérienne de la bactériocine a été vérifiée grâce à la méthode de diffusion en milieu gélosé PCA. Les effets synergiques dus à l'association de la paracaseicine A et de la céfoxitine ont été révélés par la technique des microdilutions.

Les résultats obtenus révèlent une synergie chez toutes les souches de SARM testées par la réduction des CMI de la FOX sauf chez SARM 594 dont la CMI est restée à 8 µg/ml. La synergie la plus forte est révélée chez SARM 363 avec un facteur de réduction important égale à 8 fois réduisant la CMI de 32 µg/ml à 4 µg/ml. Chez SARM 298, SARM 391 et SARM 810 la CMI de la FOX est réduite de 04 fois, de 32 µg/ml à 8 µg/ml chez SARM 298 et SARM 391 et de 16 µg/ml à 4 µg/ml chez SARM 810. Cependant, un taux de réduction très faible est observé chez 03 autres souches dont les CMI de la FOX ont baissé de 02 fois : de 16 µg/ml à 8 µg/ml chez SARM 637, SARM 936 et SARM 433, soulignant la synergie la plus faible.

Conclusion : les résultats obtenus ont démontré que l'effet synergique de la paracaseicine A associée à la céfoxitine réduit de manière considérable les CMI de ce dernier.

Mots clés : paracaseicine A, céfoxitine, effet synergique, SARM, CMI.

Abstract

Objective: verification of the antimicrobial activity of paracaseicin A produced by *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, and the evaluation of its synergistic effect in combination with the cefoxitin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Methods and results: in order to achieve our study, a strain of *Lactobacillus paracasei*, paracaseicin A producer and eight MRSA strains had been used. The bacteriocin activity was controlled using the diffusion method in PCA medium agar. Besides, the synergistic effects resulting from the combination of the paracaseicin A to the cefoxitin were shown by the microdilution method.

The results obtained showed synergy in all the MRSA strains tested, by reducing MIC of the cefoxitin except in SARM 594 which the MIC remained at 8 µg/ml. The strongest synergy is revealed in SARM 363 reducing the MIC from 32 µg/ml to 4 µg/ml, with a significant reduction factor equal to 08 folds. In MRSA 298, MRSA 391, MRSA 810 the MIC of the FOX is reduced by 04 folds from 32 µg/ml to 8 µg/ml in MRSA 298 and MRSA 391, and from 16 µg/ml to 4 µg/ml in MRSA 810. However, the lowest synergistic effect is noticed in 03 strains; MRSA 637, MRSA 936 and MRSA 433; with MIC ranging from 16 µg/ml to 8 µg/ml and a reduction factor equal to 02 folds.

Conclusion: Our results showed that the synergistic effect of the paracaseicin A in combination with cefoxitin reduced considerably the MIC of the cefoxitin.

Keywords: paracaseicin A, cefoxitin, synergy, MRSA, MIC.