



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

N°...../SNV/2020

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Kaddour Souhila et Azzi Ilhem

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : NUTRITION ET PATHOLOGIE

THÈME

**Activité antimicrobienne des souches de
Lactobacillus sp associées aux antibiotiques vis-à-
vis de certains pathogènes**

Déposé le 09/09/2020

DEVANT LE JURY

Président :	M ^{elle} . Mokhtar Meriem	MCA	U. Mostaganem
Promotrice :	M ^{me} . Kouadri Boudjelthia Nacima	MAA	U. Mostaganem
Examinatrice :	M ^{me} . Boukezzoula Nawel	MAA	U. Mostaganem

Thème réalisé à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Année universitaire : 2019/2020

Remerciement

Remerciement

Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la patience, le courage, la force, et la santé pour réaliser ce mémoire.

Nous tenons en premier lieu, à exprimer notre profonde gratitude à notre Promotrice :

M^{me}. Kouadri Boudjelthia Nacima, pour la qualité de son encadrement ;

Nous la remercions infiniment pour sa disponibilité à tout moment, ses précieux conseils constructifs, ses orientations et ses encouragements durant toute la période d'élaboration de ce travail.

Nous tenons également à exprimer nos remerciements aux membres du jury :

M^{elle}. MOKHTAR Merièm et Mme. BOUKEZZOULA Nawel

Merci d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce modeste travail.

Dédicace

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

En premier lieu à mes chers parents source de ma joie et le secret de ma force :

Mme. Benarbia M & Mr. Kaddour M

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mon cher frère

Ahmed pour ses conseils, son affection et son soutien.

À tous les membres de ma famille sans exception.

À mes chères copines.

À tous ceux qui me sont chers et que je porte dans mon cœur.

Souhila

Dédicace

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A La mémoire de ma très chère Maman que Dieu l'accueille en son vaste paradis,
Elle était toujours présente pour moi et a sacrifié tout ce qu'elle a de cher pour me prodiguer
une éducation, un soutien et un encouragement pour enfin devenir ce que je suis maintenant.

A Mon Adorable Papa,

À qui j'éprouve toujours un profond respect et qui m'a toujours soutenu moralement et
financièrement tout au long de mes études, notamment au cours de mes moments difficiles,

A mes chers frères et mes belles sœurs :

Khaled, Khalil, Amine, Hichem ET Tayeb; Amel. Fatima et Sara.

A mes neveux et nièces :

Jamila, saliha, Islem, Nihel et Barae

A ma famille **Azzi et Benhabara**

A mon cher binôme

Pour son sérieux et sa compréhension

A notre **Promotrice** pour ses encouragements.

A tous mes camarades de la promotion de nutrition et pathologie 2020 ;

Ainsi que tous mes enseignants.

ILHEM

Résumé

Résumé :

Le présent travail a pour objectif ; l'étude de l'activité antibactérienne de certaines souches de *Lactobacillus sp* associées à des antibiotiques vis-à-vis des bactéries pathogènes. Une analyse de plusieurs recherches scientifiques sur l'utilisation des antibiotiques ou des substances alternatives en association à une antibiothérapie est réalisée pour évaluer l'importance des effets synergiques et discuter les résultats obtenus par différents auteurs. L'évaluation de l'effet synergique positive ou antagoniste des associations des agents antimicrobiens (antibiotiques + bactériocine ; huile essentielle + antibiotique ; huile essentielle +bactériocine) est effectuée *in vitro* par la méthode de *E* test ou le damier qui permet la comparaison de l'efficacité des différentes combinaisons antimicrobiennes vis-à-vis de plusieurs souches pathogènes. Il est démontré que des combinaisons de bactériocines associées à différents antibiotiques tel que : polymyxine et la colistine exercent une activité antibactérienne avec un effet synergique contre les bactéries pathogènes : (*Escherichia coli* ; *Listeria monocytogenes* ; *Salmonella choleraesuis* ; *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*) par la méthode de diffusion en puits sur gélose. Aussi, il est possible d'avoir des activités antibactériennes avec différentes huiles essentielles telles que l'huile de *Pelargonium asperum* en combinaison avec des bactériocines ou des antibiotiques permettant l'inhibition de *Staphylococcus aureus* ; et *Escherichia coli*.

Mots clés : bactéries lactiques, antibiotique, activité antibactérienne, pathogènes, effet synergique.

Abstract

Abstract :

This work aims to study the antibacterial activity of lactic acid bacteria strains associated with antibiotics against pathogenic bacteria. An analysis of the various research works on the use of antibiotics or alternative substances associated with antibiotic therapy is done to evaluate the synergistic effects importance and to discuss the results obtained by different authors. The evaluation of synergistic positive or antagonistic effect of the antimicrobial agents combinations (antibiotic + bacteriocin; essential oil + antibiotic; essential oil + bacteriocin) is done by the *E*-test method or checkerboard used for the *in vitro* comparison of the efficacy of different antimicrobial combinations against several pathogenic strains.

Analysis of selected articles confirm the possibility to have an antibacterial activity with different combinations of bacteriocins and antibiotics such as polymyxin and colistin by the synergistic effect against pathogenic strains such as (*Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella choleraesuis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Yersinia enterocolitica*) by the method of well diffusion on agar. Additionally, it is possible to have antibacterial activity by different essential oils such as *Pelargonium asperum* oil associated to bacteriocins or antibiotics for different pathogens inhibition (*Staphylococcus aureus*; and *Escherichia coli*).

Key words: lactic acid bacteria, antibiotic, antibacterial activity, pathogens, synergistic effect.

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو دراسة النشاط الحيوي المضاد للبكتيريا لبعض سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك المرتبطة بالمضادات الحيوية ضد السلالات المسببة للأمراض. لم تتمكن من تنفيذ المنهجية التي يجب اتباعها نظرا الى الوضع الصحي التي تمر به البلاد، تم اجراء تحليل لمتخلف الأبحاث التي تعمل على استخدام المضادات الحيوية او المواد البديلة جنبا الى جنب مع العلاج بالمضادات الحيوية بهف تبرير أهمية هذا العمل ومناقشة النتائج التي تم الحصول عليها.

تؤكد نتائج المواد المختلفة على إمكانية وجود نشاط مضاد للجراثيم من خلال توليفات البكتريوسينات المرتبطة بمضادات حيوية مختلفة: بوليمكسين وكوليسيتين من خلال التآزر ضد السلالات المسببة للمراض مثل (*Escherichia coli*):
Yersinia، *Listeria monocytogenes*؛ *Salmonella choleraesuis*؛ *Pseudomonas aeruginosa*
(*enterocolitica*) عن طريق طريقة انتشار اجار جيد. أيضا من الممكن ان يكون هناك نشاط مضاد للبكتيريا بواسطة زيوت أساسية مختلفة مثل زيت *pelargonium asperum* وتوليفاتها مع البكتيريا او المضادات الحيوية تسمح أيضا بتطبيق مسببات الامراض المختلفة (*staphylococcus aureus et Escherichia coli*)

يتم تقييم التأثير التآزري الإيجابي او المضاد لتركيبات العوامل المضادة للميكروبات (مضاد حيوي + بكتيريوسين، زيت عطري + مضاد حيوي، زيت عطري +بكتيريوسين) بواسطة طريقة اختبار *E* او رقعة الشطرنج المستخدمة للمقارنة في المخبر لفعالية تركيبات مختلفة من مضادات الميكروبات ضد العديد من السلالات المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية: حمض اللاكتيك، مضاد حيوي، نشاط ضاد للجراثيم، سلالا ممرضة، تأثير تآزري

Liste des abréviations

Liste des abréviations :

- A.** : Acinéto**bacter**
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ARNm** : acide ribonucléique messenger
- ATB** : antibiotique
- Bl** : bactérie lactique
- BMR** : bactérie multi-résistant
- CB**: chekbord
- CFU**: colony-forming unit
- CMB** : concentration minimale bactéricide
- CMI** : la concentration minimale inhibitrice
- CO2**: dioxyde de carbone
- FAO**: **food** and agriculture organization
- FICI**: fractionl inhibitory concentration index
- HE**: huile essentielle
- KDa**: kilo dalton
- L.**: listeria
- Lb.**: Lactobacillus
- LPS**: Lipopolysaccharides
- P.**: Pseudomonas
- PDR** : Pan-Drug-Resistant
- Ph** : **Potentiel** d'hydrogène
- Plps** : proteine lonked penicillin
- SARM** : Staphylococcus aureus résistant à la méthiciline
- NCCLS**: national commit for chemical laboratory standards

Liste des tableaux

Liste des tableaux :

Numéro	Titre de tableau	Page
01	Caractéristiques des différents genres des bactéries lactiques	04
02	Habitat des lactobacilles	04
03	Classification générale et mode d'action des antibiotiques thérapeutiques	12
04	Les souches lactiques	19
05	La CMI de la nisine A, de la polymyxine B et de leur combinaison.	27
06	CMI de la colistine, de la pédiocine, de la nisine et de leurs combinaisons pour le GNB	34
07	Activité antibactérienne de la combinaison de l'huile essentielle de <i>Pelargonium asperum</i> avec la nisine exprimée selon la zone d'inhibition	37
08	Résumé des tests de synergie antimicrobienne des clones <i>MDR A. baumannii</i> par E test 2, damier et méthodes time-kill	40
09	Comparaison des résultats par test E et méthode en damier	44

Liste des figures

Liste des figures :

Numéro	Titre de figure	Page
1	Les formes cellulaires des bactéries lactiques observées au microscope électrique à transmission	03
2	Observation de <i>Leuconostoc lactis</i> au microscope électronique à transmission (x 10000).	03
3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	03
4	Morphologie en microscope électronique de <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> x1000	03
5	Observation de <i>Lactobacillus plantarum</i> par microscope électronique à transmission	04
6	Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques	09
7	Principaux mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques	17
8	Une microplaque de 96 puits	23
09	Croissance de <i>L. innocua</i> HPB13 (A) et <i>E. coli</i> RR1 (B) dans la BST en présence de nisine A et de polymyxine B.	27
10	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> (A), d' <i>E. coli</i> RR1 (B) et des variantes RvA (C), RvP (D) et RvE (E) par la pédiocine PA-1, la polymyxine E et la nisine A dans une gélose de 18 h des tests de diffusion	30
11	Images typiques de microscopie à fluorescence (comètes) de LBP humaines à gauche non exposés (A) ou exposés à la colistine à 1 100 ng/ml (B).	33
12	Zones d'inhibition obtenues par la combinaison de l'huile essentielle de <i>Pelargonium asperum</i> avec la nisine vis-à-vis de la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . A. 75 % HE <i>Pelargonium asperum</i> + 25 % de nisine. B. 25 % HE <i>Pelargonium asperum</i> + 75 % de nisine	36
13	Analyses chronologiques des isolats de test.	41
14	L'effet synergique de combinaison de deux médicaments montrant par la méthode de damier	44
15	Six bandelettes de test E différentes appliquées sur une plaque d'agar	44

Sommaire

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 01

Partie I : synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques..... 02

I.1. Généralités..... 02

I.2. Activité antibactérienne des bactéries lactiques..... 05

I.2.1. Acide lactique et acides organiques..... 05

I.2.2. Production de Di acétyle..... 06

I.2.3. Production de dioxyde de carbone..... 06

I.2.4. Le peroxyde d'hydrogène..... 06

I.2.5. La Reutéline..... 06

I.2.6. Les bactériocines..... 07

I.2.6.1. Classe I « Les lantibiotiques »..... 07

I.2.6.2. Classe II..... 08

I.2.6.3. Classe III..... 09

Sommaire

I.3. Intérêt du pouvoir antibactérien des bactéries lactiques.....	10
II. Les antibiotiques.....	10
II.1. Définition et mode d'action.....	11
II.2. Les différentes classes d'antibiotiques.....	11
II.3. La résistance aux antibiotiques.....	14
II.3.1. Types de résistance aux antibiotiques.....	14
II.3.1.1.Résistance naturelle.....	15
II.3.1.2.Résistance acquise.....	15
II.3.2. Mécanisme de la résistance.....	15
II.3.2.1. Modification de la cible des antibiotiques.....	15
II.3.2.2.La synthèse d'enzyme inactivant les ATB.....	16
II.3.2.3.Diminution de la perméabilité bactérienne.....	16
II.4. Les Alternatives de l'antibiothérapie.....	17
II.5. La synergie.....	18
Partie II : Matériel et méthodes	
II.1.Matériel :	19
II.1.1. Matériels biologique :	19
II.2.Méthodes	19
II.2.1. Préparation des souches lactiques.....	19

Sommaire

II.2.2. Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes.....	20
II.2.3. Antibiogramme des souches cibles et les souches lactiques.....	20
II.2.4. Etude de l'association «surnageant/ antibiotique ».....	20
II.2.4.1. Activité antibactérienne des souches de <i>lactobacillus plantarum</i> (surnageant) en association avec des antibiotiques par méthode sur milieu Gélosé.....	20
II.2.4.2. Activité antibactérienne des souches de <i>lactobacillus plantarum</i> (surnageant) en association avec des antibiotiques (par la méthode de microplaque)	21
Partie III : Résultats et Discussion	
III.1. Liste des articles sélectionnés.....	24
III.2. Discussion générale.....	25
Conclusion.....	45
Références bibliographiques.....	46

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité d'inhiber le développement des bactéries pathogènes. Cette capacité d'antagonisme est attribuée à la production de métabolites antimicrobiens : Les inhibiteurs non spécifiques comme les acides organiques (acide lactique, acide acétiqueetc.) (**Bourgeois et Larpent., 1996**), le peroxyde d'hydrogène et des inhibiteurs spécifiques tels que les bactériocines (**klàenhammer, 1993**). Elle représente un groupe diversifié de bactéries dont le produit majeur de fermentation est l'acide lactique (**Boukefoussa, 2012**).

L'utilisation des antibiotiques comme traitement curatif appliqué à des animaux malades soit comme un traitement préventif pour éviter l'apparition de certaines pathologies, ou encours comme un promoteur de croissance pour l'amélioration de la performance zootechnique (**Guillot, 1989**). **Gunal et al. (2006)**, ont conduit à l'émergence rapide de souches bactériennes multi-résistantes menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientées vers la recherche de substance naturelle e comme les bactériocines des bactéries lactiques (**Mehidi, 2015**). Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Tous ces critères suggèrent qu'ils peuvent être un substituant idéal de lutte contre les infections microbiennes (**Mehidi, 2015**). En effet, la résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (**Soussy, 2007**).

Le présent travail a pour objectif : l'étude de l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques associées à des antibiotiques vis-à-vis des souches pathogènes et le manuscrit s'articule autour de ce contexte en Trois parties ; la première concerne des rappels bibliographiques, la deuxième partie décrit le matériel et les méthodes nécessaires à la réalisation des travaux de manipulations et la troisième partie est consacrée à l'analyse des différents travaux de recherche concernant l'utilisation des antibiotiques et/ou des substances alternatives en association à une antibiothérapie.

Partie I

Synthèse bibliographiques

I. Les bactéries lactiques :

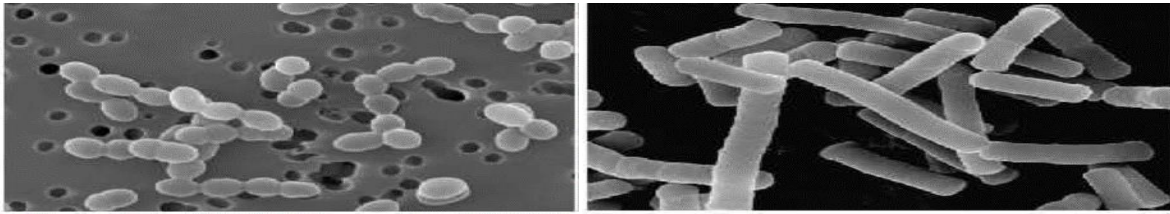
I.1. Généralités :

Les bactéries lactiques sont un grand groupe des micro-organismes non pathogènes de catégorie alimentaire regroupant un ensemble d'espèces hétérogènes (**Labioui et Elmoualdi, 2005**). Ces bactéries sont mésophiles avec une croissance de 10 °C à 40 °C et un optimum entre 25 et 35 °C, mais certaines sont capables de se développer à 5 °C ou 45 °C, elles supportent des pH de 4 à 8 (exceptionnellement de pH 3.2 à 9.6), il s'agit d'un groupe de bactéries à Gram-positif sous forme cocci (**figure 01 A**) ou bâtonnet (**figure 01 B**) (**Luis et al., 2006**). Ces bactéries exigeantes ne possèdent pas de cycle de Krebs, ni de cytochromes, ni porphyrines (composants de la chaîne respiratoire) ni catalase, ni nitrate-réductase et leur croissance requiert des acides aminés, des bases azotées et des vitamines. (**Abid, 2015 ; Adeyemo et al., 2017**). Elles ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Certaines sont dites homofermentaires alors que d'autres sont dites hétérofermentaires (**Helmut et Jürgen, 2009**) et leur croissance requiert des acides aminés, des bases azotées et des vitamines. (**Abid, 2015 ; Adeyemo et al., 2017**).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes (**Tableau 02**) et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux (plantes et fruits), les muqueuses et tube digestif humain et animal (**Drouault et Corthier, 2001**). Les principaux genres (**tableau01**) qui constituent le groupe des bactéries lactiques sont *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus* (**figure03**), *Entérocoques*, *Lactococcus*, (**figure04**) *Pediococcus*, *Leuconostoc* (**figure02**) et le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré comme un genre de bactérie lactique (**Guertarni., 2007**).

Les lactobacilles (**figure 05**) ont un métabolisme énergétique saccharolitique où le lactate est l'acide organique majoritaire (**De Vuyst et al., 1994**). Les lactobacilles ont des besoins nutritionnels complexes, ils exigent un milieu riche en hydrate de carbone comme les glucides, les acides aminés, peptides, lipides, et vitamines (**Hammes et Hertel, 2009**). Ce sont des bactéries Gram+ à sporulée, immobiles, en forme bacille isolé ou groupées en paires ou en chaînette. Elles forment des colonies de petite taille, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Ce sont des anaérobies facultatifs ayant un PH optimum de croissances de 5,5 avec une température optimale de croissance entre 30 et 40 °C (**Hammes et Hertel., 2009**).

Partie I : synthèse bibliographique



(A) La forme cocci

(B) la forme bâtonnet

Figure 01 : Les formes cellulaires des bactéries lactiques observé au microscope électronique à transmission (Makhloufi, 2011).

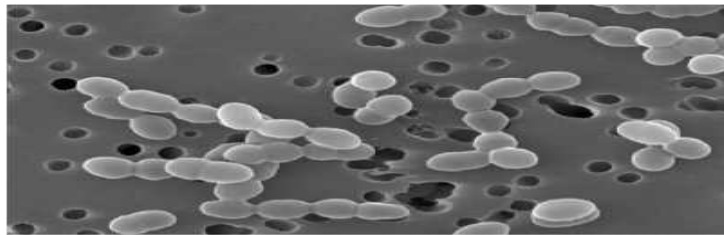


Figure 02 : Observation de *Leuconostoc lactis* par microscope électronique à transmission (x 10000).

(Bendimerad, 2013).

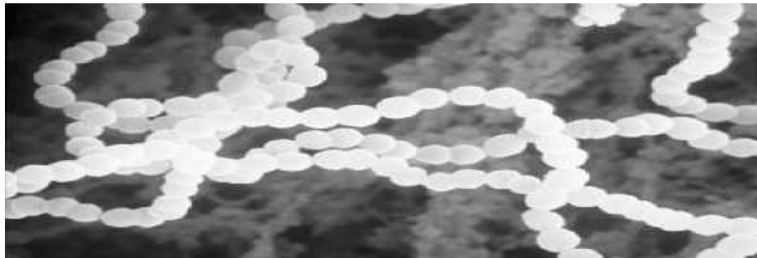


Figure 03 : *Streptococcus thermophilus* (Franck Le Guerhier, 2013).

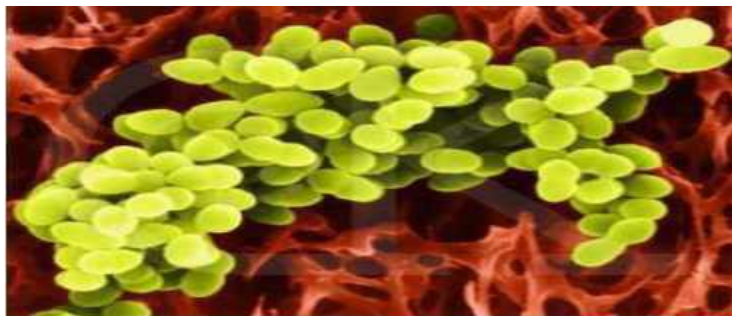


Figure 04 : Morphologie en microscope électronique de *Lactococcus lactis* sub sp lactis x1000 (Menad, 2017).

Partie I : synthèse bibliographique

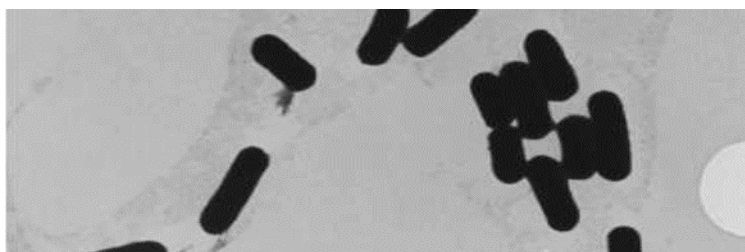


Figure 05 : Observation de *Lactobacillus plantarum* par microscope électronique à transmission (Aznar1 et Zúñiga1, 2011).

Tableau 01 : Caractéristiques de différents genres des bactéries lactiques (Berguiga et khemis., 2014).

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques	Habita
<i>lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaire hétérofermentaire	Thermophiles Mésophiles	Homme, carnés Produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	Thermophiles	Produit laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	Mésophiles croissance à 45 °C Thermorésistante	l'intestin de l'homme et des animaux, produit laitiers.
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	Mésophiles	Produit végétaux

Tableau 02 : habitat des lactobacilles (Perry *et al.*, 2004).

Habitat	Espèce rencontrés	Activités ou produits
Matériel végétale en décomposition Laiterie	<i>Lb.plantarum</i> , <i>Casei</i> , <i>Lb.</i> <i>Acidophilus</i> <i>Lb.delbrukii</i> , <i>Lb.Lactis</i>	Cornichons. Ensilage et choucroute Fromage et yaourt etc.
Tractus –gastro-intestinale des animaux orale intestinale	<i>Lb.Salivrus</i> <i>Gasseri</i> , <i>Lbhamnosus.Lb.Ceseai</i> , <i>Lb.plantarum</i>	Formation des caries dentaire Flore normale
Vagin des mammifères	<i>Lb.Vaginalis</i>	Flore normale

I.2. Activité antibactérienne des bactéries lactiques :

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques (**Hadj Abderrahman, 2015**). Les lactobacilles sont connus pour leur capacité de produire lors de leur croissance ; des composés actifs doués d'une activité antagoniste à l'égard d'un grand nombre de microorganismes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (**Matilla-Sandholm et al., 1999**).

L'activité antimicrobienne des lactobacilles est due à la production de plusieurs substances comme : les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique), le peroxyde d'hydrogène et le dioxyde de carbone. L'inhibition peut être aussi due à la production de bactériocines (**Nissen-Meyer et al., 1997**). En effet, les bactéries lactiques sont connues, par leur production de substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autres acides organiques, peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reutéline et les bactériocines. (**Leveau et al., 1991 ; De Vuyst et Leroy., 2007**).

I.2.1. Acide lactique et acides organiques :

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont des acides organiques qui sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit au format uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique acétique et formique, d'éthanol et le dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (**liu, 2003**). Leur activité antibactérienne contre les germes pathogènes s'exprime de deux manières :

- Une action directe où les acides organiques diffusent passivement à travers la membrane bactérienne sous leurs formes non dissociées. Ils acidifient le cytoplasme et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes. Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (**Aiba et al., 1998 ; Alakomi et al., 2000 ; Lavermicocca et al., 2008**).

Partie I : synthèse bibliographique

- Une action indirecte due à la tolérance de l'acidité par les lactobacilles et par conséquent, dans un milieu acide leur compétitivité bactérienne est avantagée par rapport aux autres bactéries (Servin, 2004 ; Tejero-Sarienna *et al.*, 2012).

I.2.2. Production de Di acétyl:

Le diacétyl est produit suite à la dégradation du citrate, il est synthétisé par différentes espèces de bactéries lactiques appartenant à plusieurs genres comme : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. (El Ziney *et al.*, 1998). Il présente des propriétés antimicrobiennes contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques. La concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition dépend essentiellement du microorganisme cible (Dortu et Thonart, 2009).

I.2.3. Production de dioxyde de carbone :

Le CO₂ est formé pendant la fermentation hétéro-fermentaire, il crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation du CO₂ dans la bicouche lipidique peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Dortu et Thonart, 2009)

I.2.4. Le peroxyde d'hydrogène :

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan *et al.*, 2005). Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui est parfois décrit comme étant des pseudos catalases (Strus *et al.*, 2005). Son action se manifesterait aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (Zalan *et al.*, 2005).

I.2.5. La Reutéline :

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par

Partie I : synthèse bibliographique

certaines espèces de *Lactobacillus* (El Ziney *et al.*, 1998). La fermentation du glycérol se déroulent en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par un «glycérol déshydratase» pour former de la reutérine qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutérine s'accumule alors dans le microorganisme producteur. (Vollenweider, 2004). La reutérine inhibent les enzymes à groupement thiol et présentent un large spectre d'activité qui inclue des bactéries, des champignons et des protozoaires (Galet *et al.*, 2000).

I.2.6. Les bactériocines :

Les bactériocines produites par les BL sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari *et al.*, 2009). Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Mehidi, 2015). (Figure06)

Selon Klaenhammer. (1993), les bactériocines sont réparties en trois classes :

- Les bactériocines de classe I ou lantibiotiques
- Les bactériocines de classe II : La classe II peut être subdivisée en quatre sous classes IIa à IId
- Les bactériocines de classe III

I.2.6.1. Classe I « Les lantibiotiques » :

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5KDa, stable à la chaleur. Cette catégorie comprend des bactériocines comme la nisine A, l'épidermine et la lacticine 481. Ils peuvent être divisés en deux types : Classes La : qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la Classes Lb : qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette, contenant jusqu'à 19 acides aminés (Twomcy *et al.*, 2002). Dans cette classe on retrouve la nisine A et Z produites par *Lactococcus lactis*.

Le mode d'action des lantibiotiques varie en fonction de la sous-classe dont ils font partie. Les lantibiotiques linéaires de classe La ciblent des composantes de la membrane cellulaire

Partie I : synthèse bibliographique

comme le lipide II, qui est un précurseur de la synthèse du peptidoglycane (**lubelsk et al., 2007**). La liaison de l'antibiotique et du lipide II entraîne la formation de pores dans la membrane cellulaire. De plus, la bactériocine bloque également la biosynthèse de la paroi cellulaire en empêchant l'étape de transglycosylation et en séquestrant le lipide II de son site actif situé au septum (**Hasperet et al., 2006**). L'ensemble de ces mécanismes va entraîner la mort cellulaire qui sera causée par la perte du contenu cytoplasmique (acides aminés, ions, etc.) (**Wiedeman et al., 2001**).

Les lantibiotiques globulaires (sous-classe Lb) vont plutôt interrompre les fonctions de certaines enzymes nécessaires à la synthèse du peptidoglycane (**Nagao et al. 2006**). Par exemple, la mersacidine inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire en formant un complexe avec le lipide II. Elle ne forme pas de pores dans la membrane cellulaire mais interfère avec l'étape de transglycosylation qui permet la polymérisation des chaînes glucidiques dans la formation du peptidoglycane. Ceci a pour conséquence d'empêcher les précurseurs du peptidoglycane associés lipide II d'être ajouté au peptidoglycane en croissance, entraînant graduellement la lyse de la cellule. (**Marti et al., 2004**).

I.2.6.2. Classe II :

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10KDa, stables à la chaleur ne contiennent pas d'acides aminés modifiés. Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classes IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la «mannose perméase», pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilité de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (**Arous et al., 2004 ; Vadyvaloo et al., 2004 ; Bauer et Dicks., 2005**).

Les bactériocines de classes IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (**Oppegard et al., 2007**).

I.2.6.3 : Classe III :

Ce sont des bactériocines à haute poids moléculaire (de taille >10 kDa) ; et sensible à la chaleur. La structure et le mode d'action diffèrent complètement des autres bactériocines produit par les bactéries lactiques (Nigutova *et al.*, 2007). En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocin A à un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont des spectres d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (Nilsen *et al.*, 2003).

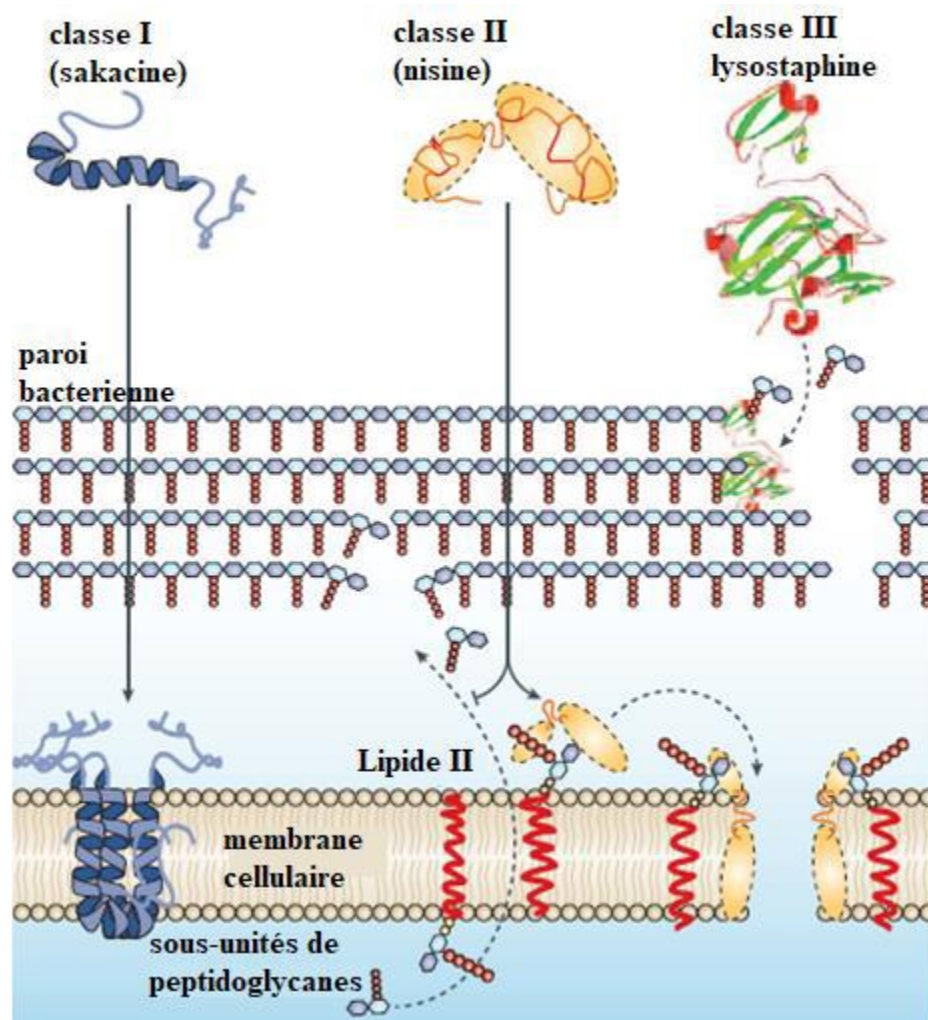


Figure06 : Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter *et al.*, 2005).

I.3. Intérêt du pouvoir antibactérien des bactéries lactiques :

Le rôle des BL sur la santé était dans le cadre des probiotiques. (Calvez *et al.*, 2009). Dans le domaine thérapeutique : étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire. (Yateem *et al.*, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types des diarrhées. (Yateem *et al.*, 2008).

Vincent *et al.* (1979) ; déterminent l'efficacité d'un mélange stabilisé de *Lactobacillus acidophiles* et *Lactobacillus bulgaricus* dans la prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques et les résultats de cette étude montrent que l'administration orale de *Lactobacillus GG* est efficace pour réduire la durée des symptômes chez les nourrissons bien nourris et les enfants atteints de diarrhée. Il ressort de certaines études aussi de la diarrhée des voyageurs, que la souche *Lactobacillus GG* est efficace en prévention des diarrhées survenant chez les touristes, et que *Lb. rhamnosus GG* a un effet thérapeutique significatif sur la durée des diarrhées en cas de gastroentérites causées notamment par les rotavirus (Sophie *et al.*, 2001). Différentes souches probiotiques, incluant *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus GG* et *L. casei* DN-114 001 ; ont prouvé leur efficacité dans la réduction de la sévérité et de la durée de la maladie diarrhéique aigüe chez l'enfant (Rosenfeldt *et al.*, 2002 ; Szajewska *et al.*, 2007 ; Lemberg *et al.*, 2007). Certaines souches sont utilisées sous forme des suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie (Yateem *et al.*, 2008).

II. Les antibiotiques :

L'antibiothérapie est un traitement médicamenteux visant à éliminer des bactéries pathogènes qui se développent et prolifèrent dans l'organisme, provoquant une infection. (Soussy, 2007).

Il existe une antibiothérapie dite « probabiliste », c'est-à-dire à large spectre d'action qui est administrée en fonction des germes en cause, puis, en absence de résultat, il y a ce qu'on appelle une antibiothérapie adaptée qui sera prescrite, ciblée sur la bactérie responsable de l'infection, et sur l'antibiotique jugé le plus efficace grâce à la réalisation d'un antibiogramme (Badet, 2019).

II.1. Définition et mode d'action :

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi-synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant une activité antibactérienne en milieu organique et une bonne absorption avec une bonne diffusion dans l'organisme. Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte (**Newman *et al.*, 2003 ; Singh et Barrett, 2010**).

Les antibiotiques ont deux modes d'action : un mode d'action dit « bactéricide » qui détruit la bactérie en attaquant le peptidoglycane de la paroi bactérienne ce qui cause une déstabilisation de la bactérie et entraîne sa mort et un mode d'action dit « bactériostatique » qui inhibe la croissance de la bactérie en agissant sur le système protéique de la bactérie : en se fixant sur la sous unité 50s du ribosome bactérien ; entraînant une inhibition de la synthèse protéique, la bactérie ne meurt pas mais ne peut plus se développer ni se multiplier (**Battraud, 2017**).

Chaque antibiotique possède un spectre d'action, correspondant aux germes sur lesquels il montre son activité antibactérienne dont le spectre d'action peut être plus ou moins large ou étroit (**Badet, 2019**). Pratiquement, un antibiotique bactéricide est nécessaire pour éradiquer complètement une infection grave ou présentant un inoculum important. Il est possible de distinguer les deux catégories en comparant la concentration minimale inhibitrice (CMI) à la concentration minimale bactéricide (CMB) : un antibiotique bactéricide est un antibiotique pour lequel la CMB est sensiblement égale à la CMI. Par contre, l'antibiotique est dit bactériostatique lorsque la CMB est largement supérieure à la CMI. Cela signifie que la concentration en antibiotique au site d'infection n'est pas suffisante pour atteindre la valeur de la CMB (**Berezin, 2001**).

II.2. Les différentes classes d'antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères (**Tableau 03**) : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Tout en adoptant la classification des antibiotiques en grandes familles ; pour chaque famille les molécules ont

Partie I : synthèse bibliographique

une structure de base commune et le même mécanisme d'action ; une famille peut être divisée en groupes et/ou sous-groupes qui ont des spectres d'activité qui diffèrent (**Hnich, 2017**).

Les réactions de synthèses sont inhibées par les antibiotiques, ces derniers se fixent sur des sites précis (les cibles moléculaires) de la cellule bactérienne ou fongique ce qui entraîne la perturbation des différents cycles métaboliques. Ainsi, chaque famille d'antibiotiques est spécifique pour chaque cible. Les cibles cellulaires ne sont pas toujours connues avec précision et correspondent à six niveaux différents de la cellule, à savoir ; la paroi, la membrane cytoplasmique, le génome (réplication et transcription du l'ADN), la traduction du ARN messenger (synthèse des protéines), le métabolisme respiratoire et le métabolisme intermédiaire (**Larpen et Sanglier., 1989 ; Yala et al., 2001 ; Lortie et Trudel., 2003**).

Tableau 03 : Classification générale et mode d'action des antibiotiques thérapeutiques (**Larpen et Sanglier, 1989**).

Cible	Familles d'ATB	Les classes	Spectre d'activités	Mode d'action
La paroi	Betalactamine	Pénems	cocci gram+ et bacilles Gram+ (pénicilline M et G) bacilles Gram-	Empêche la synthèse de la paroi bactérienne en inhibant leur enzyme
		Pénam		
		Céphams		
		monobacters		
	Fosfomycine	Fofocine	Spectre large : cocci Gram+, bacilles Gram-	
		Unidoze		
		Monuril		
	Glycopeptides	Vancomycine	Spectre étroit: Lesbactéries Gram+ staphylocoques et entérocoques.Traitement de la colite pseudomembraneuse	
		teicoplanine		
La membrane	Polymyxines	Colistine	Actifs sur les bacilles à gram-	Modifient la perméabilité de la membrane externe des bactéries Gram-
		Gramicidines et tyrocidines	Bacitracine	Spectre étroit : bactéries à Gram+
	Tyrothricine			

Partie I : synthèse bibliographique

Le ribosome	Aminosides	Streptomycine	Spectre large Cocci et bacilles Gram+ et Gram- Mycobactéries Toutes les bactéries anaérobies sont résistantes	Inhibiteurs de la synthèse protéique (fonction bactéricide).
		Néomycines		Inhibiteurs de la synthèse protéique (fonction bactéricide).
		Tobramycine		Inhibiteurs de la synthèse protéique (fonction bactéricide).
		Amikacine		Inhibiteurs de la synthèse protéique (fonction bactéricide).
		Gentamicine		Inhibiteurs de la synthèse protéique (fonction bactéricide).
	Tétracyclines	Doxycycline	Spectre large mais résistances fréquentes, actives sur les germes à développement intracellulaire	
		Minocycline		
ADN	Quinolones	Ciproflaxine	Spectre limité aux bactéries Gram- à l'exception des Pseudomonas, aeruginosa	Inhibiteur de la gyrase bactérienne (l'ADN des bactéries).
		Voflaxocine		
		Moxiflaxine		
		Oflaxacine		
		Ciproflaxine		
		Noroflaxine		
	Produits Nitrés	Oxiquinoléine	Spectre large et Spectre limité aux bactéries anaérobies (surtout les bacilles Gram- les bacilles Gram+ sporulés)	ils provoquent le relâchement des fibres musculaires lisse du myocarde. Il en résulte une vasodilatation veineuse avec une diminution de la pression intracardiaque et une vasodilatation des coronaires.
		Nitrofuranes		
		Nitroimidazole		
	Fleuroquinolones	Fluméquine	-spectre large au Pseudomonas et aux bactéries à Gram+ et Gram- notamment les staphylocoques.	
Pefloxacines				
Enoxacine				
moxifloxaciné				

Partie I : synthèse bibliographique

Polymérase		Rifamicine SV	Spectre large : mycobactéries cocci gram+ et bactéries à gram+ divers bacilles à gram- sont actives sur les germes à développement intracellulaire.	Inhibition de la transcription de l'ADN en ARN
		Rifampicine		
La synthèse de l'acide folique	Sulfamides	Sulfaméthoxazole	Spectre large théoriquement large, mais résistances fréquentes	Il inhibe le fonctionnement de la dihydrofolate réductase qui catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate.
		Triméthoprime		
	sulfazalozine			
	Triméthoprime	Triméthoprime	Spectre large-résistances beaucoup moins fréquentes	

II.3. La résistance aux antibiotiques :

L'antibiothérapie est le moyen le plus souvent utilisé pour traiter les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, l'administration d'antibiotiques, peut causer des effets indésirables tels qu'une perturbation de la flore intestinale et des complications rénales ou hépatiques **(Beaugerie et Petit, 2004)**.

La résistance bactérienne est retenue lorsqu'un ATB perd sa capacité à inhiber efficacement la croissance bactérienne. Autrement dit, les bactéries continuent de se multiplier en présence de concentrations thérapeutiques d'antibiotiques **(Hnich, 2017)**.

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce **(Guillot, 1989)**.

II.3.1. Types de résistance aux antibiotiques :

La progression de la résistance bactérienne aux antibiotiques cause des infections difficiles à traiter et pose un problème de santé publique. On distingue deux types de résistance bactérienne : La résistance naturelle et la résistance acquise **(Meskine et Benabdelkader, 2016)**.

II.3.1.1. Résistance naturelle :

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce (**Lagha, 2015**). Pour chaque classe d'ATB, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactives vis-à-vis de ces bactéries (**Meskine et Benabdelkader, 2016**)

La résistance est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Elle est programmée sur le génome bactérien et les bactéries naturellement sensibles définissent le « spectre d'activité » de l'antibiotique (**Nouri et Ziadi, 2015**).

II.3.1.2. Résistance acquise :

La résistance bactérienne acquise à un ATB est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique (**Meskine et Benabdelkader, 2016**). Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif ou de transposons (**Nouri et Ziadi, 2015**).

II.3.2. Mécanisme de la résistance :

Les principaux mécanismes responsables de la résistance aux antibiotiques (**figure 07**) chez les bactéries sont au nombre de trois, à savoir ; la modification de la cible des antibiotiques, la Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques et la diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques (**Yala et al., 2001**).

II.3.2.1. Modification de la cible des antibiotiques :

Avec une modification de leur structure, elles se rendent insensibles à l'action de l'antibiotique. C'est un des principaux mécanismes de résistance à la streptomycine, un des premiers antibiotiques utilisés pour le traitement de la tuberculose (**Rabarijaona et al., 1999**).

Partie I : synthèse bibliographique

Certaines bactéries ont développé la capacité de modifier ses PLPs, les souches de *S.Aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont résistants à l'ensemble des lactamines sont classées dans les BMR. Le Lactobacille (bactérie à Gram positif) est naturellement résistant à la Vancomycine et la Teicoplanine par modification de la cible. (Yala *et al.*, 2001).

II.3.2.2.La synthèse d'enzyme inactivant les ATB :

C'est le mode de résistance le plus répandu. On peut citer en particulier la production de Lactamases. (Hamouche et Sarkis, 2012). Les lactamases sont des enzymes d'inactivation capables d'hydrolyser le cycle -lactame en formant un complexe enzyme-substrat. Le produit final de la réaction aboutit à la formation de composés acides tels que l'acide Pénicilloïque ou céphalosporoïque. Pour certaines bactéries comme *P.aeruginosa*, certaines de ces enzymes comme les céphalosporines sont produites sur un mode inductible. Ainsi leur production augmente en présence de lactamines, puis diminue lorsque l'antibiotique est moins présent (Picard), contrairement à *A.baumannii* (Bou et Martinez-Beltran, 2000).il existe d'autres enzymes comme les acétylases, les adénylases ou phosphorylases (fréquemment rencontrées chez *A.baumannii*) qui sont responsables de la résistance aux aminosides (gentamicine, amikacine ou tobramycine parmi d'autres) (Decré, 2012).Il existe néanmoins des molécules capables d'inhiber ces enzymes. L'acide clavulanique par exemple, est produit par *Streptomyces clavuligerus* (Brown *et al.*, 1976) et est associé à l'amoxicilline pour donner l'Augmentin, un des ATB les plus vendus au monde (Grange *et al.*, 1990 ; Stapleton *et al.*, 1995). Le tazobactam (acide sulfone triazolylméthyl pénicillinique) (Aronoff *et al.* 1984) est associé avec la piperacilline (Bush *et al.*, 1993).

II.3.2.3.Diminution de la perméabilité bactérienne :

La perméabilité des canaux membranaires par lesquels l'antibiotique pénètre dans la bactérie est altérée. Ce type de résistance peut apparaître aussi par diminution du diamètre des porines chez les bacilles à Gram négatif (Courvalin, 2007). La membrane externe des bactéries à Gram négatif présente une face interne constituée de phospholipides et une face externe, constituée de Lipopolysaccharides (LPS) (Cronan *et al.*, 1987) qui représentent 75% de la surface totale de la membrane externe. Les LPS ont une forte charge négative qui facilite le passage des antibiotiques cationiques. Certaines bactéries ont développé des mécanismes de résistance qui réduisent la charge négative nette des LPS (Helander *et al.*, 1998).

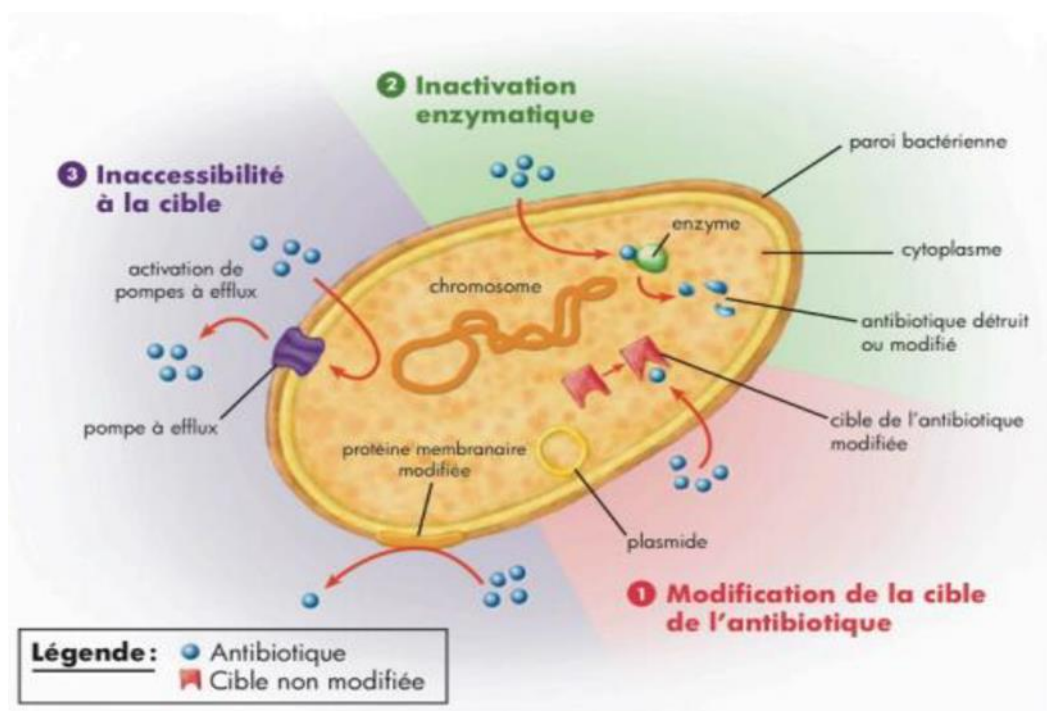


Figure 07 : Principaux mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Coustès, 2016).

II.4. Les Alternatives de l'antibiothérapie :

L'apparition de bactéries pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques particulièrement vers l'emploi de probiotiques ou de leurs métabolites. (Woodford et Livermore, 2009). Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriée ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO, 2001). Les microorganismes probiotiques les plus étudiés sont les BL en particulier les Lactobacilles. En effet, les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autres dans le lait fermenté, a fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (Penner *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide ou bactériostatique contre des espèces proches de la souche productrice (Klaenhamme, 1988), et peuvent avoir un effet synergique avec les antibiotiques sur des souches résistantes. Cependant, rare sont les travaux qui ont été réalisés mais Nagmouchi *et al.* (2013), ont réalisé une étude sur l'effet synergique entre un type

Partie I : synthèse bibliographique

d'antibiotique qui est la colistine et deux types de bactériocines : la nisine A et la pédiocine PA-1/AcH, contre *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, et d'après eux l'association des bactériocines aux antibiotiques augmentent l'effet de ces derniers (Nagmouchi *et al.*, 2013).

II.5. La synergie :

La synergie est un type de phénomène par lequel plusieurs facteurs agissant en commun ensemble créent un effet global d'action coordonnée de deux ou plusieurs bactéries ayant pour effet d'améliorer une fonction ou leur action sur une cellule cible, ou encore d'assurer leur survie (Odds F.C, 2003). La compréhension générale de la synergie est qu'il s'agit d'un effet vu par une combinaison de substances étant supérieure à ce que l'on aurait attendu d'une prise en compte des contributions individuelles. (Gani *et al.*, 2005). La synergie a été définie comme une diminution de $\geq 2 \log_{10}$ du nombre de CFU par ml par rapport à l'agent le plus actif unique (Singh *et al.*, 2002). Effet inhibiteur supérieur de leur effet seul $FICI < 1$ seul (Madhira *et al.*, 2010).

L'opposé de la synergie est l'antagonisme (ou synergie négative), phénomène dans lequel deux facteurs en combinaison ont un effet moindre que la somme de leurs effets attendus. L'antagonisme était défini comme une augmentation de $2 \log_{10}$ du nombre de colonies à 6 ou 24 h avec la combinaison Par rapport à celle du seul médicament le plus actif. Effet inhibiteur a moins à leur effet seul $FICI > 1$ (Rosato *et al.*, 2010).

Cependant, toutes les interactions entre les composés antimicrobiens peuvent altérer l'efficacité et des relations synergiques ou antagonistes et peuvent entraîner une concurrence pour une éventuelle cible principale. (Manadari *et al.*, 2007), et peuvent conduire à des changements dans la conformation structurelle, résultants ainsi dans la réduction de l'activité inhibitrice parce qu'il pourrait y avoir de nombreux mécanismes potentiels d'action sur la base d'un effet synergique au début de ce programme de recherche, nous avons donc pas pu étudier le mécanisme d'action exact (Lis-balchi *et al.*, 1997). D'autre part, un effet synergique multi-cibles pourrait se produire en impliquant des enzymes, substrats, métabolites et protéines, récepteurs, ion canaux, protéines de transport, ribosomes, ADN / ARN et physico-chimiques mécanismes).(Wagner *et al.*, 2009).

Partie II

Matériel et Méthodes

Partie II : Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes :

Dans cette partie le plan de travail qui été prévu pour la réalisation de notre étude, est détaillé

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel biologique :

Les huit souches lactiques qui devait être testées dans ce travail ont été isolées et identifiées génétiquement dans le cadre du doctorat en science de notre Promotrice (**Tableau04**)

Tableau 04 : Les souches lactiques

Souches	Identification Moléculaire PCR16s/ BLAST	Origine
LbN05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN11	<i>Lactobacillus hebarum</i>	Lait de vache
LbN12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache
LbN14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de vache

II.2. Méthodes :

II.2.1. Préparation des souches lactiques : Les souches sont conservées à - 20°C dans du glycérol, elles seront réactivées sur le milieu MRS et incubées en anaérobiose à 37°C pendant trois jours successifs. Par la suite, 200µL de cultures jeunes (de 18 à 24h) des différentes souches servent à inoculer 10ml de MRS liquide pendant trois jours successifs, afin d'obtenir une concentration initiale de 1.10^9 UFC/ml. Les tubesensemencés par des monocultures sont toujours incubés en anaérobiose à 37°C Les surnageant sont obtenues après centrifugation (8000rpm /10min) des cultures par filtration avec des filtres millipores (22µm) (**Keddari, 2014**).

II.2.2. Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes : (*Staphylococcus aureus* et *E. coli*) par méthode directe et indirect par méthode de diffusion sur gélose par des disques, brièvement :

- Des disques de papier Wattman N°1 de 6 mm de diamètre ont été préparés, stérilisés
- puis déposés à la surface des boîtes ensemencées par les souches cibles.
- Les disques sont par la suite chargés avec 10 µl de chaque culture ou surnageant.
- Les boîtes sont laissées diffusées pendant 2 heures à 4°C, puis incubées à 37°C
- pendant 18-24h. Trois essais sont réalisés pour chaque test.
- Les diamètres sont mesurés en mm et le résultat étant la moyenne des trois essais.

II.2.3. Antibiogramme des souches cibles et les souches lactiques :

La sensibilité des souches aux antibiotique devait être déterminée par la méthode de diffusion sur gélose MH /MRS (CLSI, 2010). Brièvement :

- Des disques d'ATB de différentes familles sont disposés sur la gélose MH préalablement ensemencée avec la souche teste par la méthode d'écouvillonnage.
- Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés, en mm

II.2.4. Etude de l'association «surnageant/ antibiotique » :

II.2.4.1. Activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus plantarum* (surnageant) en association avec des antibiotiques par méthode sur milieu Gélosé :

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'association Sn/ATBs est celle de diffusion sur milieu solide préconisée par Halawani (2009) ; Mandal *et al.*, (2010) ; Toroglu, (2011), brièvement :

- Un disque d'antibiotique de 6 mm de diamètre est déposé au centre de chaque boîte MH préalablement ensemencée (un disque par boîte).A l'aide d'une micropipette, 10 µl de SN sont déposés sur chaque disque d'ATB ;
- Les boîtes sont laissées diffuser à 4°C pendant 2 h puis incubées à 37°C pendant 24h ;

Partie II : Matériel et méthodes

- Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm

Le résultat étant la moyenne de trois essais ; Les données sont analysées comme suit :

- ✓ Indifférence : les deux zones d'inhibition du surnageant seul et de l'association

Sn/ATBs restent inchangées.

- ✓ Antagonisme : la zone d'inhibition de l'association Sn/ATBs est moins importante que celle du surnageant tout seule.
- ✓ Synergie : la zone d'inhibition de l'association Sn/ATBs est plus importante que celle du Surnageant tout seule.

II.2.4.2. Activité antibactérienne des souches de *Lactobacillus plantarum* (surnageant) en association avec des antibiotiques (par microplaque) :

La méthode utilisée est celle de micro-dilution en milieu liquide aussi appelée méthode de l'échiquier, car elle permet de tester le pouvoir antibactérien des surnageants bactériens seules ou en associations avec les antibiotiques. Cette méthode permet de quantifier l'interaction de deux composés antibactériens A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentrations des deux composés (Vaubourdolle, 2007).

A. Principe de la méthode de l'échiquier (le damier) : C'est une méthode de référence consistant à distribuer dans une série de micro-cupules contenant un volume déterminé de BMH, des concentrations décroissantes de substances antibactériennes et à ensemencer chaque cupule avec une suspension standardisée de la bactérie à étudier; après incubation (de 18 à 24 h), la plus faible dilution du composé antibactérien dans laquelle la croissance bactérienne est visiblement inhibée représente la CMI. Pour la détermination de la CMB, des repiquages sur gélose PCA ont été effectués. La CMI est définie comme étant la concentration la plus basse qui inhibe toute croissance visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Et la CMB est définie comme étant la concentration la plus faible capable d'entraîner la mort d'au moins 99.99% des bactéries. Elle correspondrait à celle dont les puits n'ont donné aucune croissance après repiquage et incubation de 24h à 37°C (Li, 2000).

B. Mode opératoire : Les étapes du test antibactérien sont présentées ci-dessous :

B.1. Préparation des dilutions :

Partie II : Matériel et méthodes

- Une quantité de 100 µl du surnageant est additionnée à 900 µl de (tampon PBS ou eau distillé stérile) ce qui correspond à une dilution d'un dixième.
- Une série de dilution d'ordre deux est préparée à partir de cette solution mère (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) en utilisant le même diluant
- Les dilutions des autres substances testées (antibiotiques) ont été préparées de la même manière.
- Les dilutions se font dans des minis tubes à essai et se conservent à 4°C

B.2. Préparation des inocula bactériens (souches pathogènes) : Le test antibactérien doit être réalisé sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. Avant chaque ensemencement, les inocula bactériens sont préparés de la manière suivante :

- Repiquage des souches bactériennes sur un milieu stérile (bouillon nutritif).
- Incubation environ 6 heures à 37°C afin d'obtenir des colonies bien isolées.
- Standardisation des inocula bactériens : une charge bactérienne standard pour les tests en milieu liquide qui est de 10^8 UFC/ml. Cette solution est ensuite ramenée à 10^7 UFC/ml après dilution d'un dixième dans de l'eau physiologique stérile. Les inocula bactériens doivent avoir une densité optique (DO) comprise entre 0,08 et 0,13 à une longueur d'onde de 625 nm.

B.3. Ensemencement de la microplaque : L'évaluation de l'activité antibactérienne est réalisée sur des microplaques de 96 puits contenant 12 colonnes (1 à 12) et 8 lignes (A à H) (**figure08**) ; Le puits H1 contient 100 µl du milieu de culture, 5 µl de l'inoculum bactérien, et 50 µl (tampon PBS ou eau distillée stérile) qui sert de témoin de croissance. À l'exception du puits H1, chaque puits de la ligne H (en abscisses) contient 100 µl du milieu de culture, 5 µl de l'inoculum bactérien, et 50 µl d'une dilution de l'agent antimicrobien A (surnageant) (de la plus concentrée à la plus diluée). Ensuite, À l'exception du puits H1, chaque puits de la colonne n° 1 (en ordonnées) contient 100 µl le milieu de culture, 5 µl de l'inoculum bactérien, et 50 µl d'une dilution de l'agent antimicrobien B (antibiotique) (de la plus concentrée à la plus diluée). Chaque puits du reste de la microplaque contient les mêmes quantités du milieu de culture, de l'inoculum, et 25 µl de chaque agent antimicrobien (association) ce qui permet de réaliser des combinaisons des différentes dilutions correspondant à celles des deux axes ; de telle sorte que chaque puits sera unique en ses combinaisons de doses. En fin, Après 16 à 20 h d'incubation à 37°C, les microplaques sont lues en observant le fond des cupules dans un miroir.

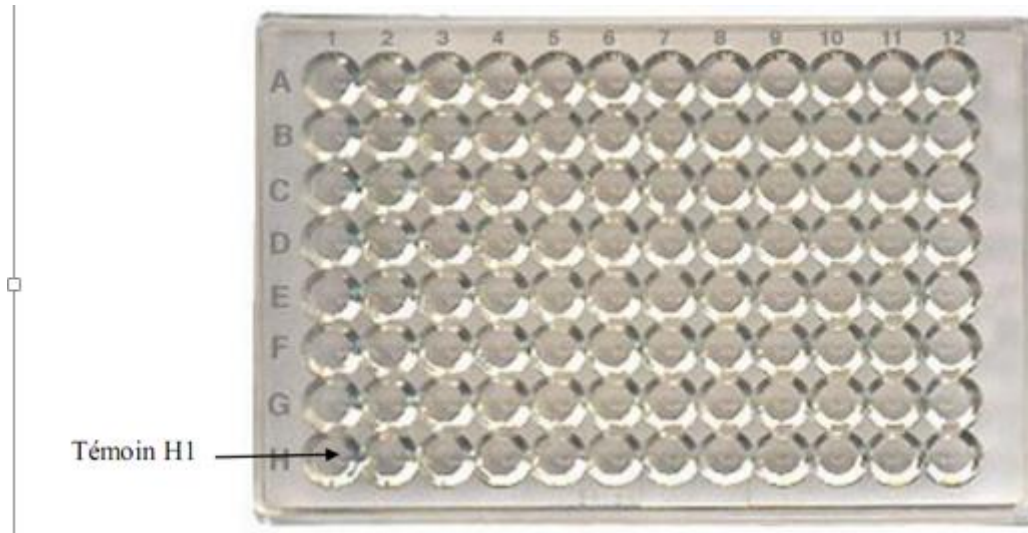


Figure 08 : une microplaque de 96 puits

Partie III

Résultats et discussion

III. Résultats et Discussion :

Cette partie est conçue par l'analyse des différents travaux de recherches sélectionnés émanant du contexte de notre étude ; afin de mettre en évidence ; l'importance de l'utilisation des associations des différentes substances naturels (antibactériennes) avec les antibiotiques pour le traitement des différentes pathologies infectieuses.

III.1. Liste des articles sélectionnés :

1-Nisin A and Polymyxin B as Synergistic Inhibitors of Gram-positive and Gram-negative Bacteria; 2010 Karim Naghmouchi, Djamel Drider, John Baah, Ron Teather.

2 -Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of Listeria monocytogenes and Escherichia Coli; 2011 Karim Naghmouchi , Yanath Belguesmia, John Baah, Ron Teather, Djamel Drider.

3-Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential to Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells; 2013 Karim Naghmouchi, John Baah, Didier Hober, Eric Jouy, Cédric Rubrecht, Famara Sané, Djamel Dridere

4-Antibacterial Activity of Pelargonium x asperum Essential Oil and its Potential Synergy with Nisin; 2017 A. Ouelhadj, L. Ait Salem, D. Djenane

5-Synergy Testing by E test, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Madhuri ;2010 Madhuri M. Julie E. Mangino, Wondwossen A. Gebreyes, Beth Biller, Tammy Bannerman, Joan-Miquel Balada-Llasat, and Preeti Pancholi

6-Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against Brucella melitensis; 2005 Gani Orhan, Aysen Bayram, Yasemin Zer and Iclal BAL

III.2. Discussion générale :

L'étude de **Nagmouchi et al. (2010)** : démontre l'effet de Nisine A et Polymyxine B en tant qu'inhibiteurs synergiques des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Le but était d'étudier l'activité inhibitrice de la nisine A en combinaison avec la polymyxine B contre

L.innocua HPB13 et *E.coli RRI* afin d'élucider la synergie possible de ces deux antimicrobiens contre les micro-organismes Gram-positifs et Gram-négatifs, par la méthode de diffusion sur gélose, selon le protocole suivant : 25 ml d'extrait de soja tryptique fondu plus levure(Difco,0,25% p / v) contenant 0,75% (p / v) d'agar a été refroidi à 47 ° C et ensemencé avec une culture TSB pendant une nuit (1% v / v) de souches sensibles de *E. coli RRI* et / ou *L. innocuaHPB13*. La gélose ensemencée a ensuite été versé dans une plaque de Pétri stérile et laissé se solidifier à température ambiante. Des puits (7 mm) ont ensuite été coupés dans la gélose à l'aide d'un perceur de liège métallique stérile et rempli de 80µl de solution de substance antimicrobienne. Les plaques ont été maintenues à 5 C pendant 2 h pour permettre la diffusion, et puis ils ont été incubés en aérobiose pendant 18 h à 30 ° C. Après cette période d'incubation, les plaques ont été inspectées pour la présence ou l'absence des zones d'inhibition. (**Wolf et Gibbons, 1996**).

La combinaison des deux substances antibactériennes a été synergique active contre les deux bactéries cibles, la nisine A seule n'a montré aucune inhibition d'*E. coli RRI*. La combinaison nisine A/polymyxine B à 1,56 / 2,5 lg ml⁻¹ a provoqué la lyse d'environ 35,86 ± 0,35 et 73,36 ± 0,14% des cellules HPB13 de *L. innocua* après 3 et 18 h, respectivement. La polymyxine B à 0,12 lg ml⁻¹ et la nisine A/polymyxine B à 4,64/0,12 lg ml⁻¹ ont réduit le nombre de cellules *RRI d'E. coli* viables d'environ 0,23 et 0,65 log₁₀ CFU ml⁻¹, respectivement de cellules viables *d'E. coli RRI* d'environ 0,23 et 0,65 log₁₀ CFU ml⁻¹, respectivement, par rapport au témoin. (**Nagmouchi et al., 2010**).

Le tableau 05 indique la CMI de la nisine A, de la polymyxine B et de leur combinaison pour *L. innocua HPB13* et *E. coli RRI. coli RRI* et de *L. innocua HPB13* est illustré à (**la figure 09**). La polymyxine B et la combinaison nisine A/polymyxine B à des concentrations d'environ 0,06 et 2,32/0,06 lg ml⁻¹, respectivement, ont produit des réductions de 0,17 et 0,45 log₁₀ UFC ml⁻¹ du nombre *d'E. coli*. **Nagmouchi et al. (2010)** ont constaté que cette combinaison a un effet synergique et inhibe la croissance de *L. innocua HPB13* et *E. coli*

Partie III : Résultats et discussion

RR1 à un degré significatif et que la concentration de nisine A requise pour le contrôle efficace des souches pathogènes de *Listeria* sp pourrait être considérablement abaissée par la combinaison avec la Polymyxine B. L'utilisation de concentrations plus faibles de la Nisine A ou la Polymyxine B devraient ralentir l'émergence de populations bactériennes résistantes à ces agents. (Nagmouchi *et al.*, 2010).

Les données recueillies dans la présente étude montrent que la combinaison de La nisine A avec de la polymyxine B à de faibles concentrations pourrait être exploitée comme stratégie alternative pour lutter contre *Listeria* et *E. coli*. L'effet de l'association peut certainement être décrit comme synergique pour les deux bactéries. Au cours de la croissance en bouillon, une réduction de 0,74 log₁₀ de *L. innocua* HPB13 CFU (par rapport à des réductions inférieures à 0,4 log₁₀ avec la nisine A seule) a été obtenue, tandis que la nisine autrement inefficace a entraîné des réductions d'*E. coli* *RR1* CFU lorsqu'il est combiné avec la polymyxine B même aux concentrations les plus faibles testées. Comme prévu, la nisine A n'avait aucune activité inhibitrice contre *E. coli* dans les tests sur bouillon ou sur gélose. En général, on pense que les membranes externes des bactéries Gram-négatives font office de barrière contre des molécules comme la nisine A, affectant leur action inhibitrice. (Nagmouchi *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus par Nagmouchi *et al.* (2010) ; montrent que la concentration de nisine A nécessaire pour un contrôle efficace des genres qui incluent des agents pathogènes connus pourrait être considérablement abaissée en la combinant avec la polymyxine B mais d'autres études restent nécessaires pour évaluer cet effet sur les souches pathogènes résistants à la nisine A ou à la polymyxine B et à différentes matrices alimentaires ou pharmaceutiques surtout que le coût d'utilisation de la nisine reste prohibitif pour de nombreuses industries, en particulier lorsque des concentrations élevées sont nécessaires pour obtenir des effets antimicrobiens satisfaisants.

Partie III : Résultats et discussion

Tableau 05 : la CMI de la nisine A, de la polymyxine B et de leur combinaison. (Nagmouchi *et al.*, 2010)

Organisme	CMI ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
	Nisine A	Polyxymine B	NisinA/ Polyxymine B
<i>L. innocua</i> HPB13	3,125	5	0,195/0,312
<i>E. coli</i> RR1	Aucun effet	0,058	0,058/0,015

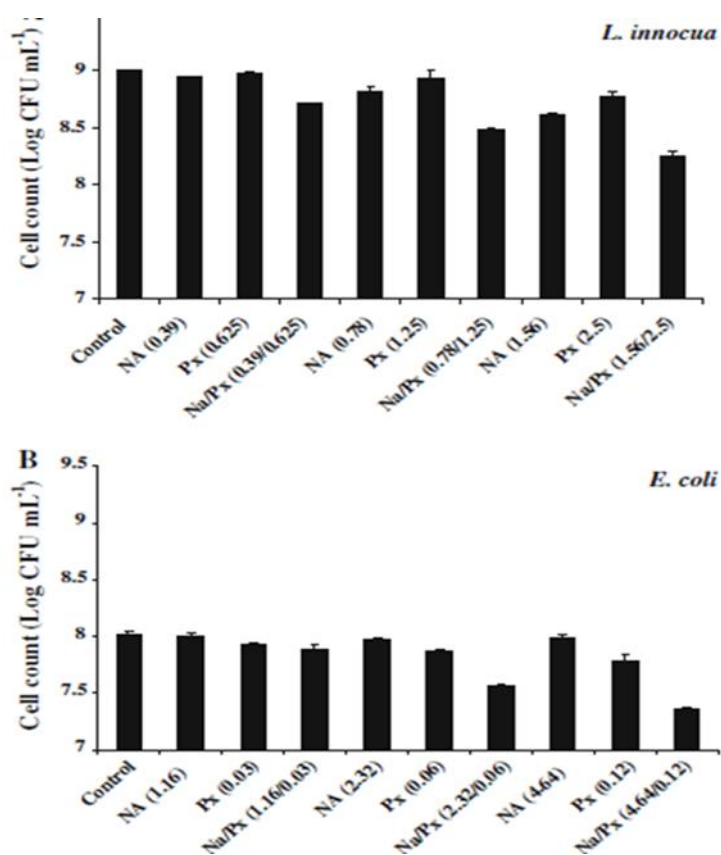


Figure 09 : Croissance de *L. innocua* HPB13 (A) et *E. coli* RR1 (B) dans la BST en présence de nisine A et de polymyxine B [Concentrations (lg ml^{-1}) sont deux, quatre et huit fois plus élevées que la CMI déterminée pour le des substances antibactériennes en combinaison] (Nagmouchi *et al.*, 2010)

Partie III : Résultats et discussion

La deuxième étude de **Nagmouchi et al. (2011)**, démontre l'Activité antibactérienne des bactériocines de classe I et IIa associées à la polymyxine E contre les variantes résistants de *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*. L'objectif de cette étude était d'étudier les effets inhibiteurs des combinaisons de Nisine A ou de Pédicocine PA-1 avec Polymyxine E sur des variant de *L.monocytogenes* sélectionnés pour leurs résistances à la nisine A ou à la pédiocine PA-1 et sur une variante d'*E. coli* sélectionnée pour sa résistance à la Polymyxine E. l'inhibition de ces organisations par ces agents seuls ou en combinaison a été évaluée en utilisant un micro-essai de dilution critique et une mesure de densité optique

La sensibilité aux agents antimicrobiens a été exprimée en tant que CMI sur la base du test de dilution. **Mota-Meira et al. (1997)** utilisant des plaques de microdosage en polystyrène à 96 puits à fond plat stériles (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA).

Les cultures ont été cultivées jusqu'à la phase logarithmique dans du TSB à 30 ° C, puis diluées au 1/1000 dans du TSB frais. Les cellules viables dans la culture diluée ont été comptées en étalant dilutions 10 fois (dans de l'eau peptonée, 0,15% p / v) sur de la gélose tryptique de soja, incubées en aérobie à 30 ° C pendant 18 h. Plaques chargées avec deux dilutions en série de pédiocine PA-1 (à partir de 20 mg / ml), nisine A(à partir de 25 mg / ml) et de la polymyxine E (à partir de 15 mg / ml) dans du TSB ont étéensemencées avec environ $2,5 \times 10^4$ CFU par puits en utilisant une culture diluée de 18 h et incubées en aérobie à 30 ° C pendant 18 h. Les densités optiques ont été lues à 650 nm en utilisant un lecteur de plaque de micro-essai Thermomax (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA).Des contrôles (puits inoculés avec la culture testée sans agent antimicrobien ajouté) et des blancs (puits contenant un milieu de bouillon non inoculé avec un agent antimicrobien ajouté) ont été exécutés sur chaque plaque. La CMI était la concentration la plus faible d'agent testé donnant une inhibition complète de la croissance (DO égale à DO du blanc). Le test était répété trois fois pour chaque combinaison antibactérienne et la CMI était la médiane des trois répétitions (**Mota-Meira et al., 1997**).

La figure N° 10; montre les zones d'inhibition de la croissance bactérienne produits par les peptides antimicrobiens et leurs combinaisons diffusant à partir de puits de gélose chargés à des concentrations initiales de dix fois la CMI déterminée par la méthode de dilution. Les zones de L'inhibition de *L. monocytogenes* était de 11 0,35, 12,5 0,7 et 18,7 0,5 mm de diamètre, respectivement, pour la nisine A (7,8 mg/ml), la pédiocine PA-1 (25 mg/ml) et la

Partie III : Résultats et discussion

pédiocine PA-1/nisine A (25/7,8 mg/ml). *E. coli* RRI étaient de 11,5 0,7 mm de diamètre en présence de polymyxine E (0,3 mg/ml) et de polymyxine E/pédiocine PA-1 (0,3/6,25 mg/ml) et 18 de 1,41 mm de diamètre en présence de polymyxine E/nisine A (0,3/7,8 mg/ml). La CMI de la bactériocine pédiocine PA-1 de classe IIa était d'environ vingt fois moins pour la variante résistante de classe I (RvA) que pour la variante résistante à la classe Iia (RvP) et était également inférieure à celle de *L. monocytogenes* (Nagmouchi *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus par la présente étude, démontrent que la souche *L. monocytogenes* de type sauvage semble être inhibé par la pédiocine PA-1 et la nisine A à des concentrations de 12 mg/ml, respectivement, et à la polymyxine E à 7,5 mg/ml. Comme prévu, la nisine A (bactériocine de classe I) et la pédiocine PA-1 (bactériocine de classe IIa) n'étaient pas actives contre *E. coli* RRI, mais cet organisme était sensible à de faibles concentrations de polymyxine E (environ 0,059 mg/ml). L'association de la pédiocine ou de la nisine avec la polymyxine E était synergique contre les cinq souches. L'association polymyxine / nisine à 9,3 / 32, 4,7 / 62,5 et 0,6 / 15,6 mg / ml a inhibé la croissance de *L. monocytogenes* résistante à la nisine, *L. monocytogenes* résistante à la pédiocine et *E. coli* résistante à la polymyxine, respectivement, par des facteurs de 94%, 97% et 74% par rapport aux témoins. (Nagmouchi *et al.*, 2011).

L'association pédiocine / nisine était efficace contre *Listeria monocytogenes* et ses variantes, mais pas *E. coli* ou son variant. La polymyxine (0,21 mg / ml) et la polymyxine / nisine (0,3 / 7,8 mg / ml) réduisaient la croissance d'*E. coli* mesurée dans la phase log de, respectivement, 31,25% et 93,54%. La croissance de *L. monocytogenes* dans les phases logarithmique et stationnaire a été réduite, respectivement, de 90,46% et 77,52% par polymyxine / pédiocine à 4,7 / 25 mg / ml. (Nagmouchi *et al.*, 2011)

Ces résultats suggèrent que la concentration efficace de bactériocine pour le contrôle de variantes résistantes de *L. monocytogenes* et *E. coli* pourrait être considérablement abaissée par combinaison avec la polymyxine E. Cela suggère la recherche de composés de type polymyxine pour augmenter l'efficacité des bactériocines et ralentir l'émergence de multi-résistants. Cela pourrait être une étape importante vers une utilisation étendue des bactériocines dans le domaine médical (Nagmouchi *et al.*, 2011). Peu d'études traitant des actions combinées des bactériocines de classe I et de classe II et, en particulier, avec des

Partie III : Résultats et discussion

peptides non ribosomaux tels que la polymyxine ont été publiées à ce jour. Aussi, la combinaison de bactériocine classe I ou de classe IIa avec la polymyxine a produit des effets synergiques, suggérant ainsi l'utilisation de concentrations plus faibles de chaque composé antimicrobien pour contrôler (effet bactériostatique) ou éventuellement éliminer (effet bactéricide) *L. monocytogenes* et *E. coli* RRI. (Nagmouchi *et al.*, 2011). L'utilisation de concentrations élevées de peptides antimicrobiens augmente également le risque de sélectionner des sous-populations bactériennes qui y résistent. Comme le montre cette étude, la concentration de nisine A ou de pédiocine PA-1 requise pour un contrôle efficace du pathogène potentiel pourrait être considérablement diminuée en combinant ces bactériocines avec la polymyxine E pour obtenir un effet synergique, en particulier lorsqu'il s'agit de variantes résistantes. La polymyxine elle-même est utilisée comme antibiotique topique. (Nagmouchi *et al.*, 2011).

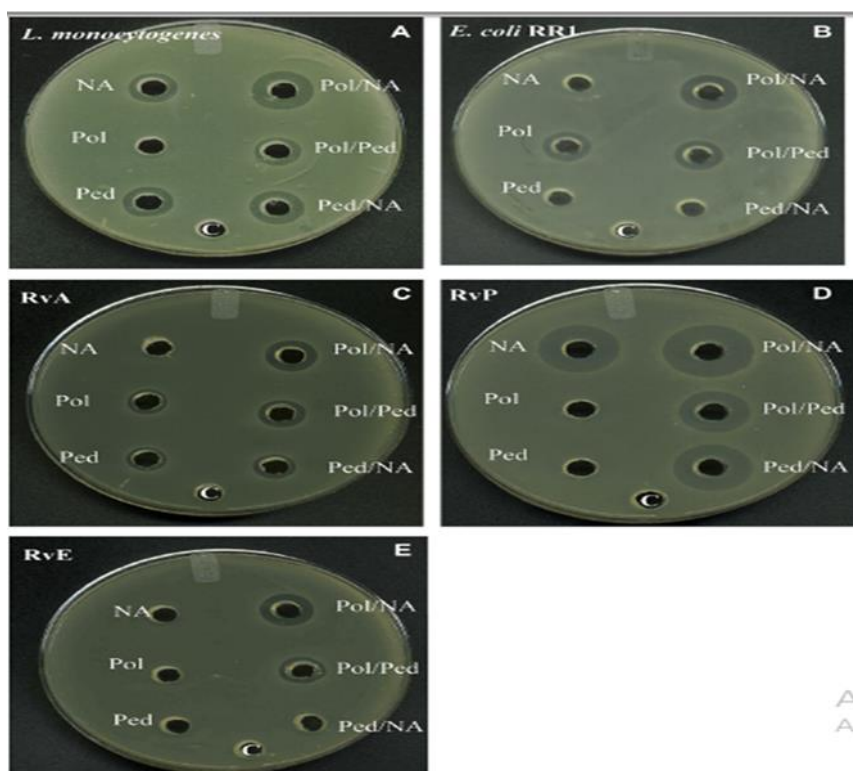


Figure 10 : Inhibition de *L. monocytogenes* (A), d'*E. coli* RRI (B) et des variantes RvA (C), RvP (D) et RvE (E) par la pédiocine PA-1, la polymyxine E et la nisine A dans une gélose de 18 h des tests de diffusion. [Les concentrations étaient 10 fois supérieures aux valeurs de CMI correspondantes du tableau 1. Le puits "C" (contrôle) ne contenait que du tampon de phosphate] (Nagmouchi *et al.*, 2011)

Partie III : Résultats et discussion

L'étude de **Nagmouchi et al. (2013)**, détermine l'effet synergique entre la colistine et les bactériocines dans le contrôle des agents pathogènes à Gram négatif et leur potentiel à réduire la toxicité des antibiotiques dans les cellules épithéliales de mammifères. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité *in vitro* de la colistine seule ou en combinaison avec des bactériocines, la nisine A et la pédiocine PA-1/AcH, contre les souches suivantes: *Salmonella choleraesuis* ATCC14028, la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC9610 et l'*Escherichia coli* ATCC35150 (O157:H7). Les activités antimicrobiennes de la colistine, de la pédiocine PA-1/AcH et de la nisine A ont été déterminées par la méthode de diffusion en puits de gélose. La CMI de chaque peptide antimicrobien (AMP) seul ou en combinaison a été déterminée par un essai de microdilution sur microplaque stérile, (Microplaques de polystyrène à 96 puits (Falcon ; Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ), selon le protocole de **Wolf et Gibbons. (1996)**, 25 ml d'extrait de soja tryptique fondu plus levure (Difco, 0,25% p / v) contenant 0,75% (p / v) d'agar a été refroidi à 47 ° C et ensemencé avec une culture TSB pendant une nuit (1% v / v) de souches sensibles d'*E. coli* *RR1* et / ou *L. innocua* *HPB13*. L'agar ensemencé a ensuite été versé dans une plaque de Pétri stérile et laissé se solidifier à température ambiante. Des puits (7 mm) ont ensuite été coupés dans la gélose à l'aide d'un perceur de liège métallique stérile et rempli de 80 µl de solution de substance antimicrobienne. Les plaques ont été maintenues à 5 C pendant 2 h pour permettre la diffusion, et puis ils ont été incubés en aérobiose pendant 18 h à 30 ° C. Après cette période d'incubation, les plaques ont été inspectées pour la présence ou l'absence des zones d'inhibition. (**Wolf et Gibbons., 1996 dans Nagmouchi et al., 2013**).

Les résultats obtenus par **Nagmouchi et al. (2013)** ; **déterminent** la souche la plus sensible à la colistine était *E. coli entéro- hémorragique* O157 : H7, qui était inhibée à une concentration d'environ 0,12 g / ml. Lorsque la nisine A (1,70 g / ml) ou la pédiocine PA-1 / AcH (1,56 g / ml) était associée à la colistine, les concentrations nécessaires pour inhiber *E. coli* O157 : H7 étaient respectivement de 0,01 et 0,03 g / ml (**Nagmouchi et al., 2013**). Ensuite, Une inhibition minimale des souches cibles a été enregistrée lorsqu'elles étaient traitées avec de la nisine A ou de la pédiocine PA-1 / AcH seule. L'activité contre les souches cibles dans ces conditions nécessitait une concentration élevée de nisine ou de pédiocine PA-1 / AcH, conduisant à des CMI de 200 g / ml. La colistine a inhibé toutes les souches cibles, donnant des CMI allant de 0,12 à 1,21 g / ml. La CMI la plus faible de la colistine observée

Partie III : Résultats et discussion

était pour *E. coli* O157 : H7, tandis que la plus élevée observée était pour *S. choleraesuis* ATCC 14028. (**Tableau 06**). (**Nagmouchi et al., 2013**).

Par ailleurs, Lorsque la colistine était associée à la nisine A ou à la pédiocine PA-1 / AcH, la CMI diminuait, indiquant une synergie effet de la combinaison de ces deux antimicrobiens et la possibilité d'inhiber la bactérie entéro-hémorragique *E. coli* O157 : H7 et qui était inhibée par des concentrations remarquablement faibles de colistine d'environ 0,01 et 0,03 g / ml associé à la nisine A (1,17 g / ml) ou pédiocine PA-1 / AcH (1,56 g / ml), respectivement (**Nagmouchi et al., 2013**).

Au finale, La combinaison *in vitro* de la colistine avec la nisine et / ou la pédiocine PA-1 / AcH dans la présente étude a révélé des effets synergiques contre les bactéries Gram négative.

Les valeurs FICI résultant de la combinaison de la colistine et de la nisine A ou de la colistine et de la pédiocine PA-1/AcH étaient inférieures à 0,50 (0,5), soulignant une synergie *in vitro* très significative. L'analyse de génotoxicité (**Figure 11**) avec le test des comètes a indiqué que la colistine provoque des dommages à l'ADN à une concentration de 550 ng/ml. (**Nagmouchi et al., 2013**).

La réintroduction de la colistine dans le circuit thérapeutique a donné lieu à de nombreuses publications vantant les mérites de cette ancienne classe d'antibiotiques polypeptidiques cationiques et cycliques (**Nagmouchi et al., 2013**). En effet, la combinaison de la colistine avec d'autres antimicrobiens tels que la fosfomycine et la tigécycline (**Corvec et al. 2013**), la teicoplanine (**Wareham et al. 2011**) et la télévancine (**Hornsey et al. 2012**) a produit des effets synergiques contre divers agents pathogènes. La colistine et la nisine sont connues pour avoir des cibles différentes sur les cellules bactériennes, et une hypothèse pour expliquer ce synergisme laisse penser que la colistine agit d'abord sur la cellule bactérienne puis la nisine atteint d'autres cibles. (**Nagmouchi et al., 2013**).

La pédiocine PA-1 / AcH a été suffisamment caractérisée pour faciliter son application comme additif alimentaire, mais son potentiel clinique est fondamentalement inexploré. L'augmentation rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques traditionnels est devenue un problème majeur de santé publique dans le monde.

Les industries, les organismes de réglementation et les politiciens ont appelé à un effort de recherche concerté pour faire face à cette situation alarmante.

Partie III : Résultats et discussion

Récemment, un panel d'experts reconnus internationalement dans le domaine des antibiotiques ont approuvé un appel mondial à l'action pour une programme international coordonné pour surmonter la rareté antibiotiques (Nagmouchi *et al.*, 2013 ; Carlet *et al.*, 2012).

La contribution de Nagmouchi *et al.* (2013), dans ce domaine consiste à mettre en avant les bactériocines comme anti-infectieuses ou du moins « adjudantes » à l'inhibition des bactéries pathogènes. Cette stratégie, si elle est validée, pourrait ralentir l'utilisation massive d'antibiotiques responsables de la propagation de la résistance dans l'environnement.

La toxicité de la colistine était la raison pour laquelle les cliniciens ont retiré ce médicament. Par conséquent, le plein potentiel des présentes découvertes ne peut être réalisé qu'après que des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques confirment les doses thérapeutiques optimales des combinaisons colistine-bactériocine (Nagmouchi *et al.*, 2013).

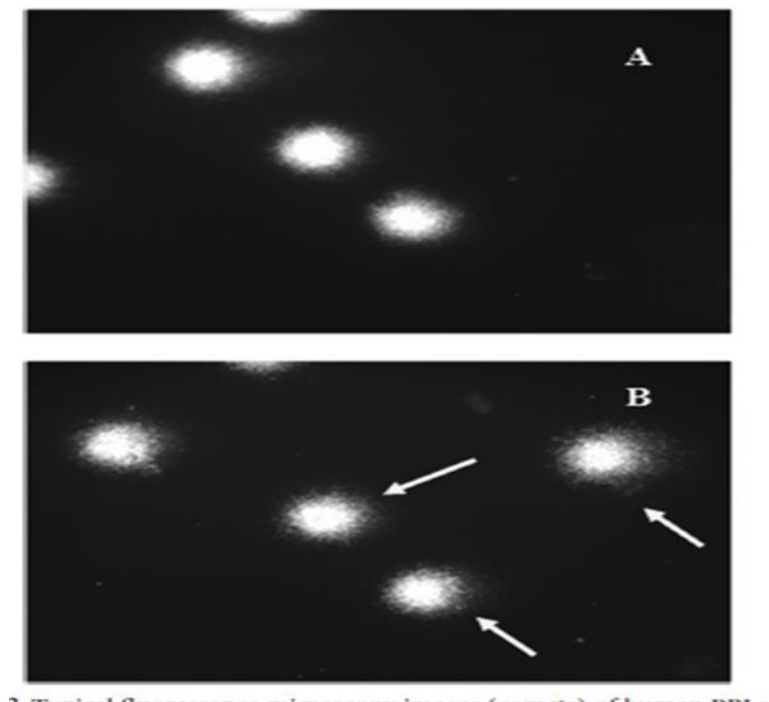


Figure 11 : Images typiques de microscopie à fluorescence (comètes) de LBP humaines à gauche non exposés (A) ou exposés à la colistine à 100 ng/ml (B). [Les flèches indiquent queues de comète indiquant des dommages à l'ADN des leucocytes après un traitement à la colistine] (Nagmouchi *et al.*, 2013)

Partie III : Résultats et discussion

Tableau 06 : CMI de la colistine, de la pédiocine, de la nisine et de leurs combinaisons pour le GNB (Nagmouchi *et al.*, 2013)

GNB	MIC (s), µg/ml (FICI) ^a			
	Colistine	Pediocine	Nisine	Colistine-pediocine
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	1,21	<200	<200	0,15/6,25 (0,12)
<i>P. aeryginosa</i> ATCC 27853	0,52	<200	<200	0,13/6,25 (0,25)
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	0,4	<200	<200	0,05/2,28 (0,12)
<i>E. coli</i> ATCC 35150	0,12	<200	<200	0,03/1,56 (0,25)

Le travail d'Ouelhadj *et al.* (2017), vise l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (HE) de *Pelargoniumx asperum* et de la bactériocine, la nisine seul et en combinaison vis-à-vis de six bactéries dont quatre sont multi-résistantes d'origine clinique. Le but de cette étude était l'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *pelargonium asperum* sous l'appellation géranium rosat, en combinaison avec la nisine pour un éventuel effet synergique vis-à-vis différentes souches bactériennes pathogènes par la méthode de diffusion sur gélose. Les tests *in vitro* de l'activité antibactérienne d'huile essentielle vis-à-vis des différentes bactéries pathogènes ont été évalués qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition et la détermination de la CMI. (Ouelhadj *et al.*, 2017).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE étudiée a été déterminée suivant la technique de macrodilution en milieu liquide rapportée par Guinoiseau, (2010). L'huile essentielle est dissoute dans du DMSO 5 % (v/v). Des dilutions un demi en série ont été préparées dans une gamme de concentration comprise de 63,38 et 0,12 µl/ml dans des tubes à essai stériles contenant le bouillon MH. 10,5 µl d'inoculum bactérien de 10⁶ UFC/ml sont déposés dans chacun des tubes de la gamme de dilution. Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 10,5 µl de la suspension bactérienne standardisée ont été déposés dans du milieu MH supplémenté en DMSO 5 % (v/v), est également réalisé. Chaque essai est répété trois fois. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, tous les tubes sont examinés, et la CMI (µl/ml) est déterminée en prenant en compte la plus faible

Partie III : Résultats et discussion

concentration en HE qui inhibe tout développement bactérien (absence de turbidité). Le contenu de tous les tubes où il n'y a pas eu de croissance visible est ensemencé sur un milieu gélosé. Un témoin négatif est réalisé à partir du tube témoin (ne contenant pas d'HE). L'absence du développement microbien implique un effet bactéricide. Chaque essai est répété trois fois. (Ouelhadj *et al.*, 2017).

Les résultats ont révélé une activité antibactérienne significative exercée par l'huile essentielle vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des diamètres d'inhibition de 36,00 ; 22,50 et 40,00 mm, respectivement (**Figure 12**). Cependant, l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* a montré une activité antibactérienne supérieure par rapport à la nisine. Les valeurs des CMI rapportées dans cette étude sont comprises entre 1,98– 3,96 µl/ml. Les combinaisons réalisées entre l'huile essentielle et la nisine ont montré un effet additif vis-à-vis d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) avec (50 % HE *Pelargonium asperum*+50 % nisine). Par contre, il a été enregistré une synergie vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* avec (75 % d'huile essentielle *Pelargonium asperum* + 25 % nisine) et contre *Pseudomonas aeruginosa* avec les trois combinaisons testées. (**Tableau 07**). (Ouelhadj *et al.*, 2017).

Les résultats obtenus par Ouelhadje *et al.* (2017) ; permettent de dire que l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* possède une activité antibactérienne ainsi que sa combinaison avec la nisine pourrait représenter une bonne alternative pour la lutte contre l'antibio-résistance (Ouelhadj *et al.*, 2017). Les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ont permis de montrer que les bactéries Gram positif sont les plus sensibles que les Gram négatifs. Il a été fréquemment rapporté dans la littérature scientifique que les bactéries Gram négatif résistent à l'effet inhibiteur des huiles essentielles et leurs composants. L'activité antibactérienne obtenue dans ce travail sur les souches multi-résistantes peut être expliquée par la présence des composés majeurs à des concentrations optimales et au mécanisme de synergie entre les molécules bioactives de l'HE de *Pelargonium asperum* et la nisine. (Oulehadj *et al.*, 2017). Généralement, il est bien admis que les composés majeurs d'une HE donnée reflètent souvent son activité biologique (Ipek *et al.* 2005), l'amplitude et les différences de leur activité dépendent de leur concentration dans le milieu en présence d'autres composés minoritaires (Oulehadj *et al.*, 2017).

Partie III : Résultats et Discussion

Cependant les actions synergiques entre les molécules issues de différentes HEs en comparaison avec l'action individuelle d'un ou plusieurs composés et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidées. Pour cela, il serait possible que l'activité d'une molécule majoritaire soit modulée par d'autres molécules minoritaires (Hoet *et al.*, 2006 ; Oulehadj *et al.*, 2017). Ces résultats soutiennent la possibilité de les utiliser comme agents naturels dans plusieurs domaines tels que les industries agroalimentaire et pharmaceutique pour lutter contre l'antibio-résistance. (Ouelhadj *et al.*, 2017).

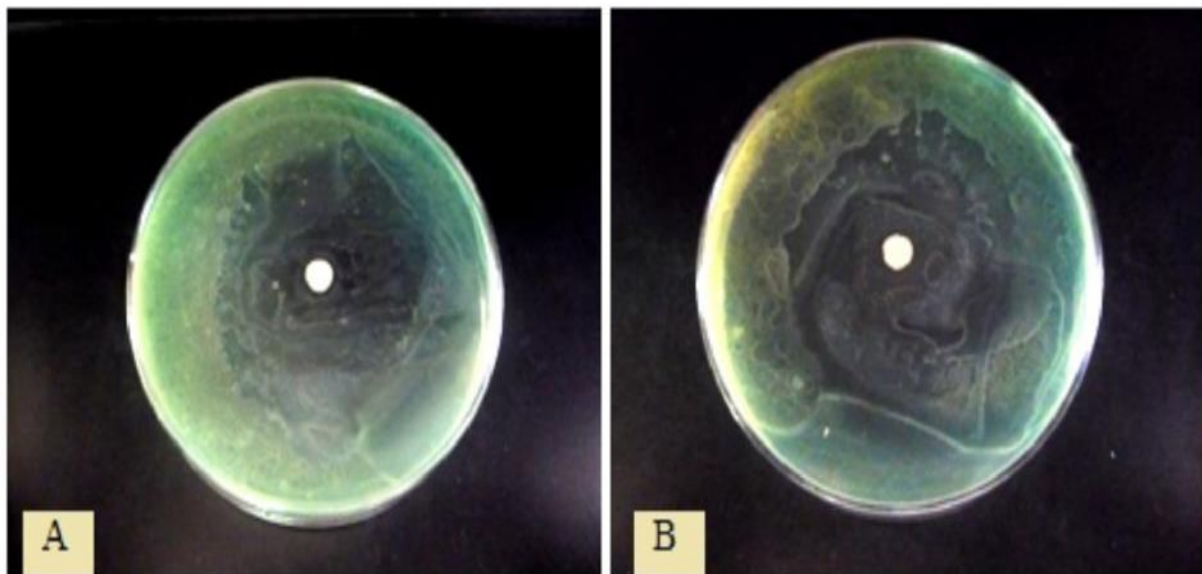


Figure 12 : Zones d'inhibition obtenues par la combinaison de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* avec la nisine vis-à-vis de la bactérie *Pelargonium aeruginosa*. A. 75 % HE *Pelargonium asperum* + 25 % de nisine. B. 25 % HE *Pelargonium asperum* + 75 % de nisine (Ouelhadj *et al.*, 2017)

Partie III : Résultats et discussion

Tableau 07 : Activité antibactérienne de la combinaison de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* avec la nisine exprimée selon la zone d'inhibition (mm). (Oulhadj *et al.*, 2017), (moyenne \pm écart type)

	50 % HE	75 % HE	25 % HE
	<i>Pelargonium</i>	<i>Pelargonium</i>	<i>Pelargonium</i>
	<i>asperum</i> +	<i>asperum</i> +	<i>asperum</i> +
	50 % nisine	25 % nisine	75 % nisine
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	13,50 \pm 0,70	21,00 \pm 1,41	16,50 \pm 0,70
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,00 \pm 0,001	7,00 \pm 7,07	6,00 \pm 0,00
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	24,50 \pm 6,36	20,50 \pm 0,70	6,00 \pm 0,00
<i>Escherichia coli</i>	9,50 \pm 0,70	20,00 \pm 1,41	25,00 \pm 1,41
<i>Klebsiella pneumonia</i>	9,50 \pm 0,70	27,50 \pm 2,12	6,00 \pm 0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57,5 \pm 10,60	62,50 \pm 3,53	62,00 \pm 2,82
Les diamètres des disques (6 mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition			

L'étude de **Madhuri *et al.* (2010)**, démontre le Test de synergie par *E* test, ou le damier de micro-dilution et méthodes Time-Kill pour *Acinetobacter baumannii* résistante aux médicaments. Le but de cette étude était de déterminer des combinaisons d'agents révélant une synergie antimicrobienne *in vitro* par deux méthodes *E* test différentes : une méthode à ratio fixe [méthode 1] et avec l'incorporation d'un médicament actif dans le milieu [méthode 2] et la méthode en damier de micro-dilution en bouillon (CB) et de comparer ces résultats avec les résultats de l'analyse time-kill. (**Madhuri *et al.*, 2010**).

Partie III : Résultats et discussion

Des clones d'électrophorèse sélectionnés parmi un total de 32 isolats ont été testés *in vitro* avec de la tigécycline, du colestiméthate, de l'imipénem et de l'amikacine dans des combinaisons à un et deux médicaments en utilisant les deux méthodes différentes d'*E* test (avec une méthode à rapport fixe [méthode 1] et avec l'incorporation du médicament actif dans le milieu [méthode 2]) et par la méthode de checkerboard (CB). La combinaison de trois médicaments imipénem, tigécycline et amikacine a également été testée par la méthode de checkerboard. (Madhuri *et al.*, 2010).

La méthode 1 (*E* test 1) selon Madhuri *et al.* (2010) consiste à inoculer des plaques de gélose Mueller-Hinton (150 mm de diamètre) avec des suspensions des isolats cultivés à (DO= 0,5 U.Mc Farland) et des bandes *E* test contenant les antibiotiques ont été ajoutées séquentiellement aux bactéries ; la première bande *E* test (bande A) était incubé pendant 1 h à température ambiante, enlevé, nettoyé avec de l'alcool et enregistré comme échelle de lecture MIC. La deuxième bande *E* test (bande B) a été ajoutée immédiatement sur l'empreinte de la première bande *E* test, bande A. Les plaques ont été incubées pendant 18 h à 35 ° C. Des bandelettes / échelles de MIC respectives ont été utilisées pour lire les MIC en plaçant dans la position de chaque dégradé. Quatre bandes *E* test ont été placées sur chaque plaque d'agar Mueller-Hinton. Quant à la méthode 2 (*E* test 2) ; il s'agit d'utiliser des plaques (fabriquées par Trek Diagnostics, Cleveland, OH) contenant du colestiméthate et celles contenant de la tigécycline. Des bandelettes d'imipénem+ tigécycline *E* test ont été testées sur ces plaques contenant du colestiméthate et des bandelettes d'imipénem + d'amikacine *E* test étaient testées sur des plaques contenant de la tigécycline. (Madhuri *et al.*, 2010).

Les CMI pour *E* test 1.(Microdilution Checkerboard; Trek Diagnostics) était déterminées comme suite: CMI des médicaments individuels imipénem (0,5 à 32 g / ml), amikacine (0,5 à 32 g / ml), tigécycline (0,015 à 16 g / ml) et colestiméthate (0,25 à 16 g / ml) et des combinaisons de ces CMI ont été déterminées en utilisant la technique de microdilution en bouillon telle que recommandée par le CLSI et décrite (Eliopoulos *et al.*, 1996 ; Moody., 1992 ; Rand, *et al.*, 1993). En bref, les plaques de microdilution de bouillon ont été inoculées avec chaque organisme d'essai pour donner la densité appropriée (10⁵ UFC / ml) dans 100 l de bouillon Mueller-Hinton (MHB) et incubé pendant 24 h à 35 ° C à l'air ambiant. Un puits sans antibiotique a été utilisé comme contrôle de croissance positif sur chaque plaque. Les plaques ont été lues pour la turbidité visuelle, et les résultats ont été enregistrés après 24 h

Partie III : Résultats et discussion

d'incubation à 35 ° C dans l'air ambiant en utilisant un lecteur à miroir grossissant, car la turbidité dans les puits indiquait la croissance du micro-organisme. (Madhuri *et al.*, 2010).

L'analyse time-kill a été réalisée selon des techniques publiées antérieurement (NACCL, 1999 ; Petersen *et al.*, 2006). Des flacons contenant du MHB avec des combinaisons à un, deux ou trois médicaments ont été inoculés avec une aliquote de phase mi-logarithmique de l'organisme d'essai à une densité d'environ 10⁶ CFU / ml dans un volume final de 100 ml et incubés sous agitation. Incubateur à 35 ° C à l'air ambiant. Les aliquotes ont été prélevées aux instants 0,6 et 24 h après l'inoculation et diluées en série dans une solution stérile de chlorure de sodium à 0,85% pour la détermination des numérations viables. Les échantillons dilués, en aliquotes de 0,05 ml, ont été étalés en double sur des plaques de Trypticase soja en utilisant un plateau en spirale. Le log₁₀ CFU / ml bactérien total a été déterminé après 18 h d'incubation à 35 ° C. (Madhuri *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats time-kill. Une synergie a été systématiquement détectée avec les associations imipénem + colestiméthate et tigécycline + imipénem. La méthode *E* test avec le médicament actif incorporé dans la gélose a permis de détecter une synergie même en présence du médicament actif et était plus comparable aux tests CB et time-kill. Une synergie a été détectée avec la combinaison de trois médicaments d'imipénem, de tigécycline et d'amikacine par les méthodes Checkerboard et time-kill parmi plusieurs clones testés. (Madhuri *et al.*, 2010).

En effet, les huit types clonaux de *Pan-Drug-Résistant Acinetobacter baumannii* présentent une résistance à l'amikacine (32 g/ml), à l'ampicilline-sulbactam (16/8 g/ml), ciprofloxacine (2 g/ml), céfépime (16 g/ml), l'imipénem (8 g/ml) et la pipéracilline-tazobactam (64/4 g/ml), (Madhuri *et al.*, 2010). L'*E* test 2 et le Checkerboard semblaient bien corrélés toutes les combinaisons testées. Parmi 32 opportunités entre les résultats de *E* test 2 et CB, 5 désaccords ont été enregistrés. Quatre clones qui étaient indifférents par *E* test 2 (tigécycline plus colestiméthate [clones 7 et 8] et amikacine plus tigécycline [clones 4 et 7]) ont montré une additivité par CB et un clone (numéro 5) qui a montré une additivité par *E* test 2 à l'imipénem plus tigécycline était indifférent par CB (Madhuri *et al.*, 2010).

L'étude a démontré la synergie de l'imipénem et de la tigécycline et les combinaisons imipénem + colestiméthate par *E* test 2 et a montré une additivité / synergie par Checkerboard. Sur la base de ces résultats *in vitro*, l'imipénem semble être un médicament

Partie III : Résultats et discussion

puissant lorsqu'il est utilisé en association contre les souches *Pan-Drug-Résistant Acinetobacter baumannii* résistantes à l'imipénème. Les combinaisons avec des antimicrobiens qui ont des sites d'action différents (imipénem+ colistine et imipénem+ tigécycline) ont montré une synergie dans au moins certains des isolats testés. Cependant, aucune synergie n'a été observée avec l'association tigécycline + colistine malgré les différents sites d'action de ces deux antimicrobiens. Ces résultats indiquent l'importance des tests de synergie pour prédire l'activité de combinaisons d'antibiotiques spécifiques contre *Pan-Drug-Resistant Acinetobacter baumannii*, mais la capacité des tests d'association *in vitro* à prédire la synergie clinique reste inconnue. (Madhuri *et al.*, 2010). D'autres études cliniques déterminant la pertinence de ces données sont justifiées. Cependant, les bénéfices cliniques de ces associations d'antibiotiques *in vivo* ne peuvent être déterminés qu'en évaluant les synergies au moyen d'études pharmacocinétiques soigneusement conçues et grâce à des essais cliniques randomisés. (Madhuri *et al.*, 2010).

Tableau 08 : Résumé des tests de synergie antimicrobienne des clones *MDR A. baumannii* par E test 2, damier et méthodes time-kill. (Madhuri *et al.*, 2010).

Clone N°	Résultats de sensibilité avec le test indiqué et l'association antibiotique ^a											
	Etest 2 ^b				Checkerboard ^c					Time-kill ^d		
	TGC +CST	IPM+ TGC	IPM+ CST	AMK+ TCG	TGC +CST	IPM+ TGC	IPM+ CST	AMK+ TGC	AMK+TSC+ AMK	IPM+ TGC	IPM+ CST	IPM+TGC+ AMK
1	I/I	I/S	S/S	I/I	I/I	A/I	A/A	I/I	A/I	NT	SND	6 h ^e
2	I/I	I/S	S/S	I/I	I/I	A/A	S/A	I/I	I/I	6 h ^e	6,24 h	6,24 h
3	I/I	S/S	S/S	I/I	I/I	S/A	A/A	I/I	I/I	6,24 h	SND	NT
4	I/I	I/S	A/S	I/I	I/I	A/I	A/I	A/A	S/I	6 h ^e	SND	6 he
5	I/I	A/S	S/S	I/I	I/I	I/I	A/A	I/I	A/I	NT	6,24 h	6,24 h
6	I/I	S/S	S/S	I/I	I/I	A/I	A/I	I/I	I/I	NT	SND	6 h ^e
7	I/I	S/S	S/S	I/I	A/A	A/A	A/I	A/A	S/I	SND	SND	6 h ^e
8	I/I	S/S	S/S	I/I	A/A	A/A	S/A	I/I	I/I	6,24 h	6 h ^e	6,24 h

Partie III : Résultats et discussion

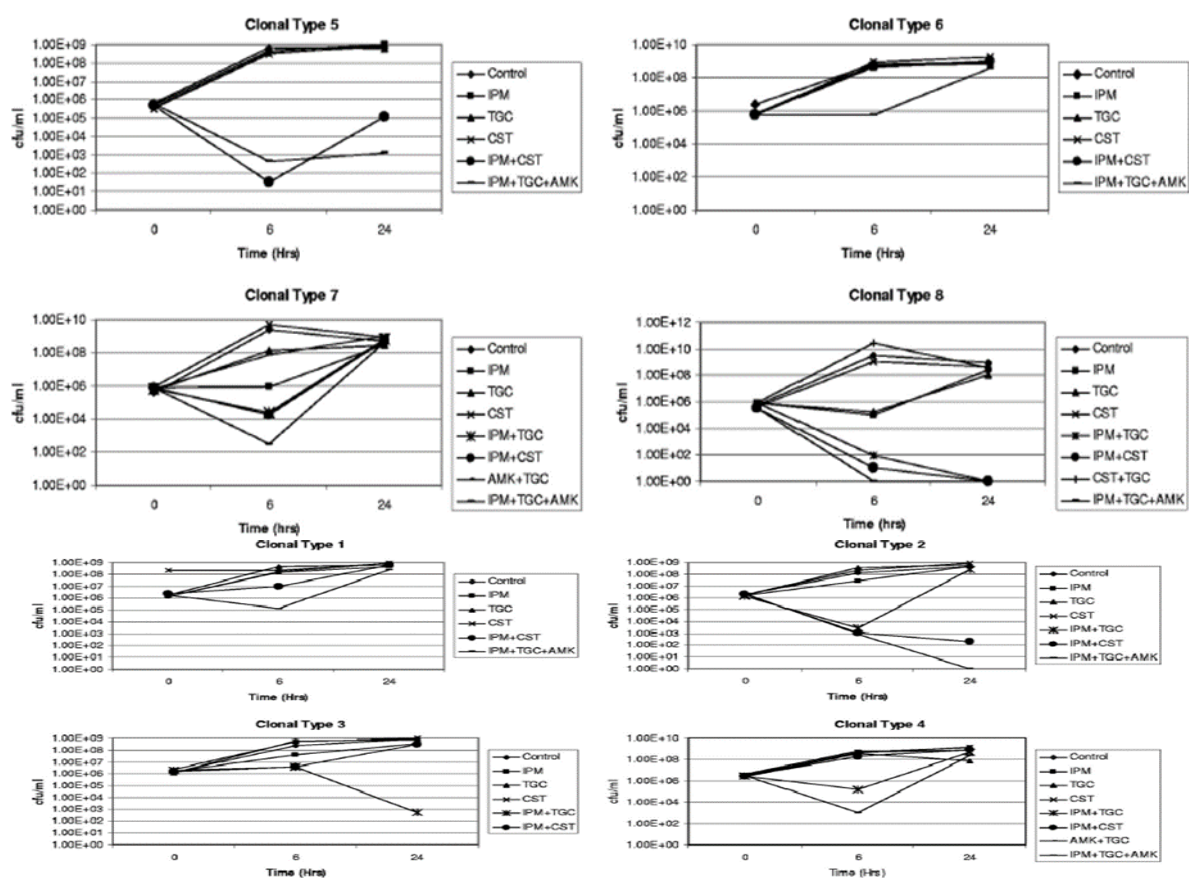


Figure 13 : Analyses chronologiques des isolats de test. (Madhuri *et al.*, 2010).

L'analyse chronologique n'a été effectuée que pour les clones qui ont montré une synergie ou une additivité avec *E* test 2 et dans plus de deux puits avec des tests de CB. Les diminutions log₁₀ du nombre de colonies à 6 et 24 h avec la combinaison antimicrobienne comparé à l'agent unique le plus actif sont représentées pour chaque type de clone. IP, imipenem ; TG, tigécycline ; CO, colistine ; AK, amikacine. (Madhuri *et al.*, 2010).

L'étude de Gani *et al.* (2005), démontre les Méthodes de test de synergie entre les antimicrobiens ; Tests de synergie par E-test et échiquier ; Contre *Brucella melitensis*. Le but de cette étude était d'évaluer le taux de concordance de deux tests *in vitro* de synergie, le test E et la méthode en damier, avec diverses combinaisons d'antibiotiques qui pénètrent la paroi cellulaire contre les isolats de *Brucella melitensis* récupérés dans le sang. Deux méthodes de test de synergie différentes, le damier et les méthodes de test *E*, ont été utilisées pour comparer les efficacités *in vitro* de diverses combinaisons antimicrobiennes à 16 souches de *Brucella melitensis* isolées à partir d'hémocultures. Selon les protocoles suivants :

Partie III : Résultats et discussion

1) Le *E* test :

Un inoculum égal à un standard de turbidité Mc Farland 0.5 a été préparé à partir de chaque isolat de *Brucella*, et 101 de la suspension ont été inoculés sur des plaques d'agar Mueller-Hinton avec 5% de sang de mouton. Des bandelettes de test *E* de RIF, DOX, SXT, SM, AZM et CIP (AB Biodisk, Solna, Suède) ont été stockées à -20 ° C jusqu'à utilisation. Les bandelettes de test *E* ont été appliquées séparément aux plaques de culture inoculées en utilisant un gabarit, comme recommandé par le fabricant, et les plaques ont été incubées à 35 ° C pendant 48 h dans des conditions aérobies (**Figure. 15**). Pour les tests, les combinaisons de bandelettes de test *E* ont été placées sur le même milieu de culture dans une formation croisée, avec un angle de 90 ° à l'intersection entre les échelles aux CMI respectives pour

B. melitensis, et les plaques ont été incubées à 35 ° C pendant 48 h. (**Gani et al., 2005**).

La détermination des CMI par le test *E* a été réalisée en double, selon les recommandations du fabricant, et les CMI ont été interprétées au point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette de test *E*. L'indice de concentration fractionnelle inhibitrice (FIC) (FIC) a été calculé sur la base de la zone d'inhibition résultante comme suit : $FIC A / FIC B$, où FIC A est la CMI de l'association / CMI du médicament A seul, et FIC B est la CMI de l'association / CMI du médicament B seul. (**Gani et al., 2005**).

2) La méthode de damier :

Formes de poudre standard de RIF (Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo.), DOX (Sigma Chemical Co.), SXT (Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ), SM (Sigma Chemical Co.), AZM (Pfizer Inc., New York, NY) et CIP (Miles Inc., New Haven, Connecticut) ont été stockés entre 2 et 8 ° C jusqu'à utilisation. Les solutions mères et les dilutions doubles en série de chaque médicament pour au moins doubler la CMI ont été préparées selon les recommandations du NCCLS immédiatement avant le test (**Bajaksouzian et al., 1997 ; Gu'r et al., 2001**). Un total de 50 l de bouillon Mueller-Hinton a été distribué dans chaque puits des plaques de microdilution (**figure 14**). Le premier antibiotique de l'association a été dilué en série le long de l'ordonnée, tandis que le second médicament a été dilué le long de l'abscisse. Un inoculum égal à un standard de turbidité Mc Farland de 0,5 a été préparé à partir de chaque isolat de *Brucella* dans un bouillon Mueller-Hinton (BBL). Chaque puits de micro-titre a été inoculé avec 100 l d'un inoculum bactérien de 5×10^5 CFU / ml, et les plaques

Partie III : Résultats et discussion

ont été incubées à 35 ° C pendant 48 h dans des conditions aérobies. Le damier résultant contient chaque combinaison de deux antibiotiques, (**Gani et al., 2005**).

Les résultats obtenus par **Gani et al. (2005)** : Le taux de concordance du test E et des méthodes en damier s'est avéré être de 55%. Les résultats les plus concordants ont été trouvés pour la combinaison streptomycine-doxycycline dans 12 tests (75%), dans lesquels quatre souches ont montré une activité synergique par le test E et une activité antagoniste par la méthode en damier et une souche a montré une activité antagoniste par les deux méthodes. Même si chacune de ces méthodes utilise des conditions et des paramètres différents, les résultats des deux méthodes s'accordent fréquemment. (**Gani et al., 2005**).

Afin de prévenir les rechutes et les complications, les patients doit bien adhérer aux protocoles de traitement, sinon l'administration insuffisante des médicaments entraînera la phagocytose bactéries pour réinfecter l'hôte. Par conséquent, de nombreuses études ont menées ces dernières années pour tester les résultats de cette méthode comparée à celles d'une autre sensibilité *in vitro* tests. (**Gani et al., 2005**).

Les méthodes de test en damier et E se sont révélées concordantes dans certaines études (**Cercenado et al. 1996**), mais dans d'autres, les résultats du test E se sont avérés concordants avec ceux d'autres tests de synergie (**Bonapace et al. 2000, Kobayashi et al.,f 1997**). **White et al. (1996)** ont comparé la méthode du damier, méthode temporelle et test E pour étudier les effets de quatre différentes combinaisons d'antibiotiques contre *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Il y avait un accord de 44 à 88% entre les méthodes time-kill et damier et accord de 63 à 75% entre les méthodes de test temporel et E. Le taux de un accord entre le damier et les méthodes de test E a été trouvé à 75%. Les tarifs de l'accord obtenu avec les combinaisons RIF-DOX, RIF-SXT, SXTDOX, SM-DOX et AZM-CIP étaient de 63,75, 31,25, 13,75, 62,5, et 56,25%, respectivement (**Tableau 09**). Même si chacune de ces méthodes utilise des conditions différentes et les critères d'évaluation, il y avait un accord fréquent entre les résultats .La méthode du damier est difficile et chronophage pour une synergie antimicrobienne de routine mais nous suggérons que le test E peut facilement être appliqué à tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de *B. melitensis*, moins de travail et moins de temps. (**Gani et al., 2005**).

Partie III : Résultats et discussion

Tableau 09 : Comparaison des résultats par test E et méthode en damier (Ghani *et al.*, 2005)

Activité	Nbre (%) de souches									
	RIF-DOX		RIF-SXT		SXT-DOX		SM-DOX		AZM-CIP	
	CB	ET	CB	ET	CB	ET	CB	ET	CB	ET
Synergie	10(62,5)	15(93,7)	2(12,5)	6(37,5)	4(25)	6(37,5)	7(43,7)	11(68,7)	10(62,5)	12(75)
Indifférence	4(25)	1(6,25)	8(50)	7(43,7)	6(37,5)	4(25)	4(25)	4(25)	4(25)	4(25)
Antagonisme	2(12,5)		6(37,5)	3(18,7)	6(37,5)	6(37,5)	5(31,2)	1(6,25)	2(12,5)	
Total	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)

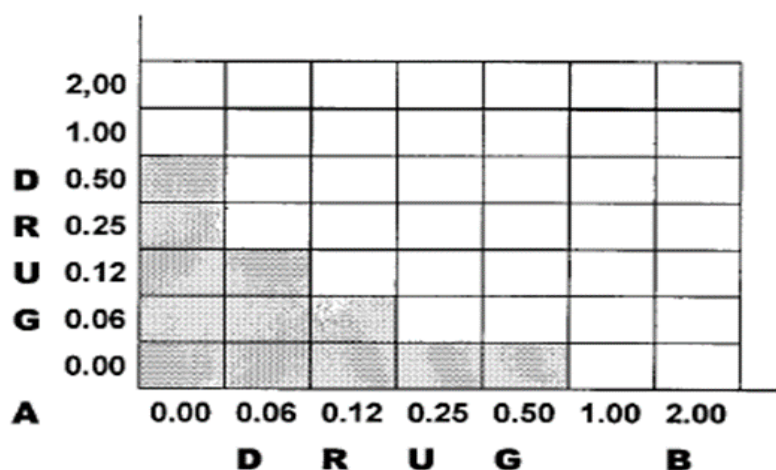


Figure 14 :l'effet synergique de combinaison de deux médicaments montrant par la méthode de damier (Gani *et al.*, 2005).

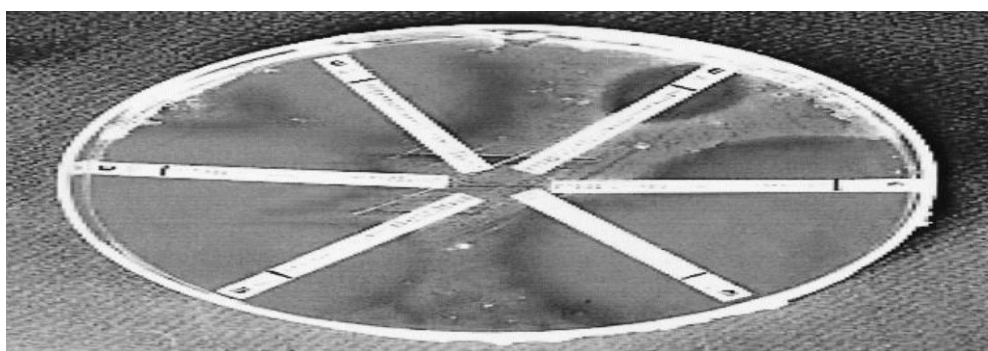


Figure. 15 : Six bandelettes de test E différentes appliquées sur une plaque d'agar (Gani *et al.*, 2005).

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

Les bactéries lactiques ont un intérêt primordial dans l'alimentation. Elles jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme. De nombreuses bactéries lactiques à activité antimicrobienne ont été mises en évidence en exploitant les potentialités inhibitrices naturelles par des tests d'interaction entre les bactéries pathogènes et les isolats de bactéries lactiques. (Moraes *et al.*, 2010 ; Penaud, 2006 ; Marth *et al.*, 2001 ; Yateem *et al.*, 2008). Les antibiotiques ont pendant longtemps été utilisés pour améliorer les performances en élevage et en médecine humaine. Cette utilisation a entraîné une augmentation des risques d'antibio-résistance et d'hypersensibilité chez l'homme. Parmi les alternatives aux antibiotiques, l'utilisation de bactéries probiotiques, notamment les lactobacilles, a été proposée et elle a prouvé son efficacité sur la santé animale (Wilson, Sigeo, *et al.* 2005).

Les différentes études analysées, démontrent bien, l'effet antibactériens des combinaisons des bactériocines en association avec les différents agents antimicrobiens comme (la colistine et polymyxine) par un effet synergique (Nagmouchi *et al.*, 2010 ; Nagmouchi *et al.*, 2011 ; Nagmouchi *et al.*, 2013). Aussi, L'association de certaines huiles essentielles aux bactériocines ou aux antibiotiques a clairement inhibé la croissance de différents pathogènes. (Oulhadj *et al.*, 2017).

Nous concluons que l'effet synergique positive, ou antagoniste des associations d'agents antimicrobiens (antibiotique + bactériocine ; huile essentiel + antibiotique ; huile essentiel + bactériocine...etc.) est généralement évalué par la technique du *E* test et /ou le test de damier qui est utilisée pour comparer *in vitro* l'efficacité des différentes combinaisons antimicrobiennes contre plusieurs souches pathogènes, alors Il serait intéressant d'essayer ces techniques pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne de nos souches lactiques (*Lactobacillus plantarum*) associées à des antibiotiques vis-à-vis des pathogènes de toxico-infections.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives, donc en perspective il serait important d'exploiter l'isolement des molécules bioactives et envisager l'évaluation de leurs effets toxiques avant toute application.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

- **Abid, Z. (2015) :** Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien «Jben», Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. Master : 90.
- **Adeyemo; S.M. Afolabi; F.T. Awojobi; K.O. Abiri; T.O. (2017):** Probotic effects of lactic acide bacteria and its use as bio-preservative for tamato juice and paste International Journal of Probiotics & Prebiotics ((Vol. 12, Issue 2)
- **Aiba; Y. Suzuki; N. Kabir; AM. Takagi; A. Koga: Y. (1998):** Lactic acid-mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. Am. J. Gastroenterol. 93: 2097-2101.
- **Alakomi; HL. Skytta; E. Saarela; M. Mattila-Sandholm; T. Latva-Kala; K. Helander; IM. (2000):** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2001-2005.
- **Aronoff; S. Jacobs; R. Johenning; S. Yamabe; S. (1984):** Comparative activities of the 13-lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 26, 580-582.
- **Arous; S. Dalet; K. Héchard Y. (2004).** Involvement of the operon in resistance to class IIa bacteriocins in L. monocytogenes. FEMS Microbiol. Lett. 238: 37-41.

Références bibliographiques

-B-

- **Bajaksouzian; S, M, A. Visalli; M, R. Jacobs, and P. C. Appelbaum. (1997):** Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters as determined by checkerboard and time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1073–1076.
- **Battraud M P., (2017).** La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité. Thèse de Doctorat en pharmacie. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille. Université de Lille 2. 13-54p
- **Bauer R ; Dicks L.M.T., (2005).** Mode of action of lipid II-targeting antibiotics. *International Journal of Food Microbiology.* 101: 201-216.
- **Bou G ; Martinez-Beltran J., (2000).** Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 428-32
- **Boukefoussa Z., (2012).** Etude de l'effet probiotique de quelques bactéries lactiques vis-à-vis de l'intolérance au lactose. Mémoire du Magister en Biologie/ Sciences Alimentaires. L'Université Hassiba Ben-Bouali- Chlef. 15 p
- **Boumediene K., (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Mémoire de Magister en Biologie. Faculté des SNV/STU. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen. 04p
- **Bonapace; C, R. White; R, L. Friedrich; L, V. Bosso; J, A. (2000):** Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 38:43–50.

Références bibliographiques

- **Bourgeois C. M ; Larpent J. P., (1996).** Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentations alimentaires. Technique et documentation, Lavoisier. Paris. 432-704.
- **Brown; AG. Butterworth; D. Cole; M (1976):** Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. J Antibiot; 29: 668–669
- **Bush; K. Macalintal; C. Rasmussen; B. A. Lee; V. J. Yang; Y(1993):** Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37:4, 851-858.

-C-

- **Carlet; J. Jarlier; V. Harbarth; S. Voss; A. Goossens; H. Pittet; D (2012):** Ready for a world without antibiotics? The penicillin antibiotic resistance call to action. Antimicrob. Resist. Infect. Control 14:1–11
- **Cercenado; E. Garcia-Garotte; F. Bouza; E. (1996):** Activity of different antimicrobial combinations against methicillin-and teicoplanin-resistant coagulase- negative staphylococci: utility of the E-test for the determination of the effects of antimicrobial combinations, p. 209. Abstr. 39th Intersci. Conf
- **CLSI. (2009).** performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement, vol. 29, no. 3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, D.C
- **Corvec; S. Furustrand Tabin; U. Betrisey; B. Borens; O. Trampuz; A. (2013):** Activities of fosfomycin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended- spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a foreignbody infection model. Antimicrob. Agents Chemother. 57:1421–1427

Références bibliographiques

- **Cotter; P D. Hill; C. Ross; R P (2005):** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Natural Review Microbiology*. Three (10): 777-788.
- **Courvalin P., (2007).** La résistance des bactéries aux antibiotiques combinaisons de mécanismes bichimiques et génétiques. *Bull. Acad. Vét.* 161:1, 7-11.

-D-

- **De vuyst L; Vandamme E. J., (1994).**A bacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: *Bacteriocin of lactic acid bacteria*. End. Blacki Academic & Profitionel, Londre.
- **De vuyst L; Leroy F., (1994).**Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13, 4, 194-9.
- **De vuyst L ; Vandamme J., (2007).** Nisin, a lantibiotic produced by. *Lactococcus lactic subsp. Lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and application. 151
- **Decré D., (2012).** *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : Un modèle d'adaptation. *Revue Francophone des Laboratoires*, 441, 43-52.
- **Dortu C ; Thonart P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Enviorn*, 13: 143-154.
- **Drouault S ; Corthier G., (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research, BioMed Central*, 32 (2), 101-117.

Références bibliographiques

-E-

- **Eliopoulos G. M ; Mollering Jr., (1996).** Antimicrobial combinations, p. 330–396. In V. Lorain (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- **El-Ziney; M.G. Uyttendaele; M. Debevere; J. Jakobsen; M (1998):** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. Biotechnol. Lett. 20 (10): 913-916.

-G-

- **Guarino; A. Canani; RB. Spagnuolo; M. Immacolata; Al. Fabio; B. Linda; O (1997)**Bacterial Therapy Reduces the Duration of Symptoms and of Viral Excretion in Children with Mild Diarrhea Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition: - Volume 25 - Issue 5 - pp 516-519
- **Guillot J.F., (1989).** Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Annales de Recherches Vétérinaires. 20 (1) : 3-16
- **Gunal; M. Yayli ; G. Kaya ; O. Karahan ; N. Sulak; O. (2006):** the effects of antibiotic growth promoter , probiotic or organic acid supplementation on performance , intestinal microflora and tissue of broilers. International journal of poultry science 5(2) :149-155
- **Gu'r; D. Bal ; C. So'yletir; G (2001):** Antibiyotik duyarlılık testleri ic, inuygulama standartları onbirinci bilgi eki, p. 114. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, Turkey.
- **Guinoiseau E., (2010).** Molécules antimicrobiennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat à l'université de Corse, France

Références bibliographiques

- **Guetarni H., (2007).** Etude de l'effet des bactéries lactiques sur l'inhibition des bactéries impliquées dans la physiopathologie digestive *in vitro*. Hassiba ben bouali Chlef. Magister : 120.

-H-

- **Hammes W.P ; Hertel C., (2009).** Genus I. Lactobacillus. Dans : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
- **Hamouche E ; Sarkis D.K., (2012).** Évolution de la sensibilité aux antibiotiques de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009. *Pathologie Biologie*, 60:3, 15-20.
- **Hasper; H. E. Kramer; N. E. Smith; J. L. Hillman; J. D. Zachariah; C. Kuipers; O. P. Kruijff; B. Breukink; E (2006):** An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II, *Science* 313, 1636-1637.
- **Helander; I. K. Alakomi; H. L. Latva-Kala; K. Mattila- Sandholm; T. Smid; E. J. von Wright; A (1998):** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram- negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590-3595.
- **Helmut K ; Jürgen F., (2009).** Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. pp 3-41
- **Hnich H., (2017).** La résistance bactérienne. mécanismes et méthodes de détection au laboratoire. Thèse doctorat en médecine. Faculté de médecine et pharmacie Maroc. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 16-30p
- **Hoet; S. Stevigny; C. Herent; MF. et al (2006):** Anti-trypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med* 72:480–2

Références bibliographiques

- **Hornsey; M. Longshaw; CC. Phee; L. Wareham; DW (2012).** *In vitro* activity of telavancin in combination with colistin versus Gram-negative bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3080 –3085.

-I-

- **Ipek; E. Zeytinoglu; H. Okay; S. et al (2005):** Genotoxicity and anti genotoxicity of origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem* 93:551–6

-K-

- **Klaenhammer T.R., (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349
- **Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3): 39-85.
- **Kobayashi; Y. Kizaki; M. Mutou; A. et al (1997):** Synergy with imipenem, panipenem or meropenem and vancomycin against carbapenem resistant MRSA detected by two different methods. 20th Int. Conf. Chemother., abstr.2297.
- **Kumari; A. Makeen; K. Garg; A.P. Marotta; F. Gupta; C (2009):** effect of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* MTCC3038. *Int. J. Prob. Preb.* 4(3): 1-6.

-L-

- **Labioui H ; Elmoualdi L., (2005) :** Sélection des souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin Soc Pharm. Bordeaux*, 144 :237-250.
- **Lagha N., (2015).** « Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Références bibliographiques

isolées de l'hôpital de Laghouat » .Thèse de Doctorat en Sciences. Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen. 10-11 p

- **Lavermicocca; P. Valerio; F. Lonigro; SL. Di leo; A. Visconti; A (2008):** Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Curr. Microbiol.* 56: 175-181.
- **Liu S., (2003).** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83 (2): 115-131.
- **Lubelski; J. Rink; R. Khusainov; R. Moll; G. N. Kuipers; O. P (2008):** Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin, *Cellular and molecular life sciences* 65, 455-476.
- **Luis José ; P. Carolina Ricoy; C. Adriane Bianchi; P. Carlos Ricardo; S.(2006):** Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. arch. biol. technol.* [online]. 2007, vol.50, n.3, pp.512-542. ISSN 1678-4324.

-M-

- **Madhuri; M. Julie; E. Wondwossen; A. Beth; B. Tammy; B. Joan-Miquel; B. Preeti; P. (2010):** Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, Nov. 2010, p. 4678–4683
- **Mandalari; G. Bennett; R.N. Bisignano; G. Trombetta; D. Saija; A. fauldus; C.B. Gasson; M.J. Narbad; A. (2007):** Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a by-product from the essential industry. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 2056-2064.

Références bibliographiques

- **Matilla-Sandholm; T. Mättö; J. Saarela; M. (1999):** LAB with health claim interactions and interference with gastrointestinal flora.
- **Mehidi N., (2015).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle. Mémoire du Diplôme Master en Agronomie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaib Tlemcen Algérie. 23-25p
- **MENAD N., (2017).** Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de Salmonella sp, Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. Doctorat: 196.
- **Mota-Meira; M. Lacroix; C. Lapointe; G. Lavoie; MC (1997):** Purification and structure of mutacin B-Ny 266: a new lantibiotic produced by Streptococcus mutans. FEBS Lett 410:275–279.

-N-

- **Nagao; J. Asaduzzaman; S. M. Aso; Y. Okuda; K. Nakayama; J. Sonomoto; K. (2006):** Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm, Journal of bioscience and bioengineering 102, 139-149.
- **Naghmouchi; K. Drider; D. Baah; J. Teather; R. (2010):** Nisin A and polymyxin B as synergistic inhibitors of Gram positive and negative bacteria. Probiotics Antimicrob. Proteins 2, 4e10.
- **Naghmouchi; K. Belguesmia; Y. Baah; J. Teather, R. Drider; D. (2011):** Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of Listeria monocytogenes and Escherichia coli Research in Microbiology 162 99e107
- **Nagmouchi; k. Baah; j. Hober; D. Jouy H. Rubtrcht; C. Sané; F. Drider; D (2013):** Synergistic Effect between Colistin and Bacteriocins

Références bibliographiques

in Controlling Gram-Negative Pathogens and Their Potential To Reduce Antibiotic Toxicity in Mammalian Epithelial Cells

- **Nccls., (1999).** Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- **Newman; D.J. Cragg; G.M. Sander; K.M. (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products.* 66 (1): 1022-1037p
- **Nigutova; K. Morovsky; M. Pristas; P. Teather; R.M. Holo; H. Javorsky; P. (2007):** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 102(2): 563-569.
- **Nilsen; T. Nes; I.F. Holo; H. (2003):** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 5, 2975-84.
- **Nissen-Meyer; J. Hauge; H.H. Fimland; G. Eijsink; V.G.H. Nes; I.E. (1997):** Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action

-O-

- **Odds F. C. (2003)** .Synergy, antagonism, and what the chequer board puts between them *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 1
- **Oppegard; C. Rogne; P. Emanuelsen; L. Kristiansen; P.E. Fimland; G. Nissen-Meyer; J. (2007):** The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13(4): 210-219.

Références bibliographiques

- **Ouelhadj; A. Ait Salem ; L. Djenane ; D. (2017) :** Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pelargonium x asperum* et son potentiel synergique avec la nisine © Lavoisier SAS à corriger

-P-

Petersen; P. J. Labthavikul; P. Jones; C. H. Bradford; P. A. (2006):
In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial

-R-

- **Rand; K. H. Houck; H. J. Brown; P. et al. (1993):** Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:613–615
- **Ratisbonne-Zafimahova, K. A., (2009).** Caractérisation de deux souches de *Lactobacillus sakei* utilisées dans la fermentation des produits carnés, Montpellier ii et Montpellier i. Master : 40.
- **Ratsitorahina M ; Aurégan G., (1999).** Replacement of streptomycin by ethambutol in the intensive phase of tuberculosis treatment: no effect on compliance. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3:1, 42-46.
- **Rebergogne-Berezin E., (2001).** Antibiotiques antibactériens : classification, principes et règles d'utilisation. *Rev. Prat.* 51, 903-909
- **Ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria: their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action.** *Recent Res. Devel. Microbiol.*
- **Rosato; A.M. Piarulli; F. Corbo; M. Muraglia; A. Carone; M.E. Vitali; C. (2010):** *In Vitro* Synergistic Action of Certain Combinations of Gentamicin and essential Oils *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17, 3289-3295

Références bibliographiques

- **Rotstein D ; Kao J., (1988).** The spectrum of Escherichia coli - Bacteroides fragilis pathogenic synergy in an intraabdominal infection model. Can. J. Microbiol. 34: 352-357. Department of Surgery, University of Toronto, Western Hospital, 399 Bathurst St., 8-304, Main Pavilion, Toronto, Ont., Canada M5T2S8.

-S-

- **Servin AL., (2004).** Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS. Microbiol. Rev. 28: 405-440.
- **Singh S.B ; Barrett J. F., (2006).** Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. Biochemical Pharmacology. 71 (7): 1006-1015.
- **Sophie D ; Gérard C., (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé (Lactinex ; Hynson, Westcott et Dunning, Baltimore, MD).
- **Stapleton ; P. King; A. Shannon; K. French; G. Phillips; I. (1995):** Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemotherapy. 39: 2478-83.
- **Soussy C.J., (2007).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Les infections urinaires pp 21-46

-T-

- **Tejero-Sarinena; S. Barlow; SJ. Costabile; A. Gibson; GR. Rowland; I (2012):** *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. Anaerobe. 18(5): 530-538.

Références bibliographiques

- **Twomey; D. Ryan; M. Meaney; B. Hill; C. (2002):** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 82: 165-185.

-V-

- **Vincent; G. John; A. Romankiewicz (1979):** Jeffrey Moss and Henry Ws Murray *Am J Hosp Pharm* 36:754-757 (Jun)
- **Vollenweider S., (2004).** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 64: 16-27.

-W-

- **Wagner H ; Ulrich-Merzenich G., (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, 97-110. *Phytomedicine*, Vol. 8(5), pp. 401–409 © Urban & Fischer Verlag 2001 The School of Pharmacy, University of London, London, United Kingdom
- **Wareham; DW. Gordon; NC. Hornsey; M. (2011).** *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1047–1051
- **Wiedemann; I. Breukink; E. van Kraaij; C. Kuipers; O. P. Bierbaum; G. Kruijff; B. Sahl; H. A. (2001).** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity, *Journal of biological chemistry* 276, 1772-1779.
- **White; R. L. Burgess; D. S. Manduru; M. Bosso; J. A. (1996):** Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1914–1918.

Références bibliographiques

- **Wolf CE ; Gibbons WR., (1996).** Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. J Appl Bacteriol 80:453–457
- **Woodford, N., and Livermore, D.M., (2009).** Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge .J. infect. 59:S4-S16.

-Y-

- **Yala; D. MerAad ; D. Mohamed ; M.N. Ouarkoric ; H. (2001) :** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91 p8.
- **Yateem ; A. Balba ; M. T. Al-Surrayai ; T. Al-Mutairi ; B. Al-Daher ; R. (2008):** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. Int. J Da ir y Sci., 3: 194-199.

-Z-

Zalan; Z. Barath; A. Halasz; A. (2005): Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains. Food Technol. Biotech. 43(3): 219- 225.