



HAL
open science

Les bactéries lactiques isolées d'aliments traditionnels marocains : production de bactériocines et applications potentielles contre des pathogènes multirésistants aux antibiotiques

Kamar Amensag

► **To cite this version:**

Kamar Amensag. Les bactéries lactiques isolées d'aliments traditionnels marocains : production de bactériocines et applications potentielles contre des pathogènes multirésistants aux antibiotiques. Chimie analytique. Université de Strasbourg; Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc), 2019. Français. NNT : 2019STRAF024 . tel-03934550

HAL Id: tel-03934550

<https://theses.hal.science/tel-03934550>

Submitted on 11 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences Chimiques ED-222

UMR 7178

THÈSE en cotutelle

présentée par :

Kamar AMENSAG

soutenue le : **18 septembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

et le grade de : **Docteur de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah**

Discipline/ Spécialité : Microbiologie - biologie moléculaire

**Les bactéries lactiques isolées d'aliments traditionnels marocains :
Production de bactériocines et applications potentielles contre des pathogènes
multirésistants aux antibiotiques**

THÈSE dirigée par :

Mr. Saïd ENNAHAR

Mme. Rajae BELKHOUB

Maître de conférence, Université de Strasbourg

Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès

RAPPORTEURS :

Mme. Catherine PERRIN

Mme. Amina BOUSETA

Mr. Hassan HAJJAJ

Professeur, Université de Montpellier 1

Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès

Professeur, Université Moulay Ismail, Meknès

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. Philippe ANDRE

Mr. Mohammed EL HASSOUNI

Professeur, Université de Strasbourg

Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès

AVANT PROPOS

Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès (*Centre d'études doctorales : Sciences et Technologies- Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments-LASSA*) et l'Université de Strasbourg (*Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 - Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives et Pharmacognosie, CAMBAP*), avec le soutien financier du programme de coopération bilatérale *franco-marocain Toubkal* : PHC-Volubilis : N° MA/14/309 - Campus France N° 30366TM. Ce travail a bénéficié également d'un appui financier des laboratoires *PHarmaceutical Institute (PHI)* (Rabat-Maroc), et de l'*équipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives et pharmacognosie*. Une bourse de mobilité internationale (1 mois) a été attribuée par l'Université de Strasbourg.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

- Hammi I, Amensag K, Ennahar S, Delalande F, Marchioni E, Cianferani S & Belkhou R. (2019) Native production of pediocin PA-1 by *Enterococcus faecium* E16 isolated from goats' cheese. *Journal of Food & Nutrition Research* 58(1).
- Amensag K, Ennahar S, Akhtach S, Guessous M & Belkhou R. (2019) Enhanced killing of multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* through a combined action of antibiotics and bacteriocins. *South Asian Journal of Experimental Biology*, accepté le 11 juin 2019.

Communications :

Communications orales :

- Kamar AMENSAG, Rajae BELKHOUE, Yousra ELHAMMOUDI et Saïd ENNAHAR. Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées des produits du terroir marocain. Fès, 28-29 décembre 2016. Congrès National Innovation & Management de la Qualité des Aliments. P52.

- Kamar AMENSAG, Saïd ENNAHAR et Rajae BELKHOU. Effet des bactériocines produites par des souches issues du biotope marocain sur des souches pathogènes humaines multi-résistantes. Fès, 28-29 et 30 novembre 2018. Congrès International sur l’Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments « ICIQFS ».

Communications par affiches :

- Kamar AMENSAG, Yousra ELHAMMOUDI, Saïd ENNAHAR, Rajae BELKHOU. Isolement et identification des bactéries lactiques : la mise en évidence de leur pouvoir antagoniste. Fès, 13 octobre 2015. Journée Scientifique du Doctorant en Biologie de l’USMBA « JSDB-USMBA 2015 ».
- Kamar AMENSAG, Yousra ELHAMMOUDI, Saïd ENNAHAR, Rajae BELKHOU. Isolement des bactéries lactiques à partir des produits fermentés : la mise en évidence du pouvoir antagoniste. Fès, 28-29 décembre 2016. Congrès national Innovation& Management de la Qualité des Aliments. P76.
- Kamar AMENSAG, Rajae BELKHOU, Saïd ENNAHAR. Purification et optimisation de la production des entérocoques L50A et L50B produites par une souche d’*enterococcus durans* : étude de leur activité antibactérienne vis-à-vis de souches pathogènes alimentaires. Fès, 28-29 et 30 novembre 2018. Congrès International sur l’Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments « ICIQFS ».

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

A ma très chère mère Mohiba AMRI : A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur : Tu représentes pour moi, l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de consentir depuis ma naissance. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

A mon Père Hassan AMENSAG : A mon école d'enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eus pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon très cher frère Ismail AMENSAG : Qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi. Mon ange gardien et mon fidèle accompagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Présent dans tous mes moments d'examens par ton soutien moral et tes belles surprises sucrées. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour, avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon cher mari Karim EL KABDANI : Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour t'exprimer mon affection et mes pensées, Tu es pour moi un homme exceptionnel sur qui je peux compter. Je te dédie de modeste travail en témoignage de mon respect, mon affection et ma reconnaissance envers toi. Que dieu nous accorde une vie pleine d'amour et de bonheur.

A ma belle-sœur Aicha RHANDOR : je te dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection et de mon attachement indéfectible. Que Dieu t'accorde santé et succès à toi et à mon cher frère pour faire de vous un couple uni et heureux à jamais.

A notre petit prince encore fœtus, mon neveu : En témoignage d'amour je te dédie cette thèse, Je t'attends avec patience, pour te prendre dans mes bras, pour goûter le nouveau goût que tu donneras à notre petite famille.

A ma belle-mère Fatna OUALI ALAMI : pour ton attention particulière, ta prière et ton amour. Que Dieu te donne bonne santé et longue vie parmi nous.

A toutes la famille AMENSAG, AMRI et EL KABDANI, petits et grands

A mes ami(e)s et mes collègues : Meryeme AISSAOUI, Rizlane Berghout, Yousra EL HAMMOUDI, Sihame AKHTACH, Marwa OUALI ALAMI, Mamadou BALDE, Naima ZEIN, Zakaria, Meryeme, Chhrazad, Amal et Houssin EL KABDANI, Hiba OUAZZANI, Samia et Rayhane OUALI ALAMI ...

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous ceux que j'aime.



REMERCIEMENTS

À l'issue de ce travail de thèse, j'ai le plaisir de présenter mes sincères remerciements :

A Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté de réaliser ce travail de thèse.

A mes chers directeurs de thèse, Mme Rajae BELKHOUCHE et Mr. Saïd ENNAHAR. Aucun mot ne me suffit pour exprimer ma profonde gratitude. Cette thèse n'aurait jamais pu se réaliser sans votre soutien, votre œil critique qui m'a été très précieux pour structurer ce travail et pour améliorer la qualité des différentes sections. Merci d'avoir accepté de diriger mon travail de recherche, de m'avoir fait connaître le monde scientifique, de m'avoir formée, d'avoir eu confiance en moi, merci pour votre humanité et votre bienveillance. Je vous remercie pour votre patience et votre compréhension des situations diverses et vos encouragements. Merci infiniment pour vos conseils, votre aide, vous étiez et vous resterez toujours mon exemple. Je désire que vous trouvez dans ces mots toute ma reconnaissance. Grace à vous j'ai vécu, à travers cette thèse, une expérience enrichissante à la fois intellectuellement et personnellement.

A Mme Amina BOUSETA et Mr. Eric MARCHIONI pour m'avoir si chaleureusement accueillie dans leurs équipes, m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions. Merci pour leurs encouragements et pour leurs nombreuses qualités humaines.

A Mr. Mohammed BENLEMLIH le doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz pour tous les efforts déployés au cycle doctoral et pour le bon déroulement de la formation suivie.

A Mr. Ali BEN BASSOU directeur de l'Ecole Supérieure de Technologie Fès, Université Sidi Mohammed Ben Abdallah Fès, pour son aimable accueil au sein de l'EST pour réaliser une partie de ma thèse.

A tous les collaborateurs pour la disponibilité des infrastructures qui a permis le bon déroulement de ce travail de thèse

Au Pr. Mohammed EL HASSOUNI de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdallah Fès, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Aux professeurs ; Catherine PERRIN de la Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1, Amina BOUSETA de la Faculté de sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdallah de Fès et Hassan HAJJAJ de la Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail de Meknès de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

Au professeur Philippe ANDRE de la Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'évaluer ce travail.

A tous les membres du Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments (LASSA), professeurs Rabia BOUSLAMTI, Sanae LAIRINI et Ahde EL IMACHE pour leurs encouragements et leur gentillesse. Un remerciement particulier à Ahmed TICHOUT pour son aide précieuse. Merci aux thésards : Yousra EL HAMMOUDI, Sihame AKHTACH, Adil LAAZIZ et Salwa TSOULI SRHIR pour les beaux moments qu'on a passés ensemble au cours de ces années de thèse.

A tous les membres de l'équipe CAMBAP, Sonia, Diane, Christophe, Céline, Minjie, Martine et Ludivine pour leur chaleureux accueil, gentillesse, respect et conseils. Merci à tous les thésards qui sont devenus Docteur : Mamandou, Randa, Yasmine, Ikram, Ye et Zélie. Merci de m'avoir aidée à s'intégrer dans l'équipe et pour avoir entretenu une ambiance agréable pour le travail.

A Mme Maria SEDRATI, pharmacienne responsable à Pharmaceutical Insitute, je vous remercie d'avoir financé une partie de ce travail. Merci pour vos encouragements et votre ouverture d'esprit.

Au Dr. Mohamed Guessous pharmacien biologiste, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, afin de réaliser la dernière partie de mon travail de thèse. Merci pour votre gentillesse et votre générosité. Merci à toute l'équipe de microbiologie au Laboratoire Guessous d'analyses médicales. Merci à Leila, à Sabah, à Hanane et à Abdelkarim pour leur aide, leur disponibilité d'être toujours prêts à répondre à mes questions, pour votre soutien moral, et surtout votre bonté de cœur. Que Dieu vous accorde une vie pleine d'amour, de bonheur et de réussite.

A mon bras droit, la future doctoresse Sihame AKHTACH, je ne trouve pas les mots qui peuvent exprimer ma reconnaissance. Merci pour les centaines de boîtes qu'on a préparées, pour les calculs infinis qu'on a effectués, merci pour les nuits blanches que nous avons passées pour finaliser ce travail, merci pour ton aide, pour ta disponibilité à tous les moments, merci

surtout à ton sourire qui n'a jamais quitté ton visage juste pour m'encourager et me pousser à l'avant. A travers ce long chemin j'ai gagné une nouvelle amie sur qui je peux compter. Merci ma chère amie.

A Yousra EL HAMMOUDI, pour les moments qu'on a passés ensemble au laboratoire, pour avoir entretenu une ambiance agréable pour le travail, pour notre amitié avant et après la thèse. Je te souhaite une bonne continuation pour ta thèse et une vie pleine de santé et de bonheur.

A toutes les personnes qui m'ont aidée, qui ont fait de mon séjour à Strasbourg une expérience inoubliable. Merci Mr Saïd ENNAHAR pour votre accueil, votre gentillesse, et votre générosité, merci à Naima Zein d'être toujours à mes côtés le long de mes premiers jours difficiles à Strasbourg, merci à Mamadou pour ces encouragements et ses conseils pendant mes moments de faiblesse. Merci à Yasmine, Genildo, Yè, Randa, Nesrine, Beatrice et Imene pour les moments inoubliables qu'on a passés, pour les éclats de rire, pour les voyages qu'on a faits, nos courses derrière les trains et les bus... tout cela restera gravé dans ma mémoire.

A mes parents, Mohiba AMRI, Hassan AMENSAG et à et mon unique frère Ismail AMENSAG, de m'avoir soutenue toutes ces années. Que vous trouvez ici ma reconnaissance, ainsi que ma gratitude pour votre soutien financier et moral depuis ma naissance jusqu'à ce jour pour aboutir à ce rêve et faire de moi ce que je suis.

A mon mari Karim EL KABDANI, je te remercie pour ton soutien inconditionnel durant ces deux premières années de mariage et qui ont coïncidé avec la phase la plus difficile de mes études. Merci pour tes encouragements, pour ta patience et pour ton soutien moral et financier. Ton amour et ton affection remplissent mes jours de bonheur.

A Zakaria EL KABDANI, Rizlane BERGHOUT, Houssin EL KABDANI, Aicha RHANDOR et Fatima ELKABDANI d'être toujours prêts à m'aider, de m'avoir rendu beaucoup de services à chaque fois que j'en avais besoin. Je vous remercie pour votre amour et votre soutien. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite. Veuillez trouver avec ceci un modeste geste de reconnaissance et remerciements.

A toutes les personnes ayant collaboré de près ou de loin d'une manière ou d'une autre et permis, par leur collaboration, leur soutien et leur avis judicieux, de mener à bien ce travail : Merci à tous et pour tout.

LISTE DES ABREVIATIONS

A	: Adénine
ABC	: ATP Binding Casquette
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adénosine-Triphosphate
BHI	: Brain Heart Infusion
BHRe	: Bactéries Hautement Résistantes
BMRe	: Bactéries Multi-Résistantes
C	: Cytocine
C3G	: Céphalosporines de troisième génération
CIP	: Collection de l'Institut Pasteur
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
Da	: Dalton
EC	: <i>Escherichia coli</i>
ECBU	: Examen CytoBactériologique des Urines
ESI Q-TOF	: Electrospray-Ionisation Quadrupole Time-of-Flight
FPM	: Force Proton Motrice
G	: Guanine
GRAS	: Generally Recognized As Safe
HPLC	: Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
I	: Intermediare
LPS	: Lipopolysaccharides
MM	: Masse Moléculaire
MRS	: Man, Rogosa et Sharpe
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Réaction en Chaîne par Polymérase
PDP	: Prélèvement Distal Protégé
PLP	: Protéines Liant les Pénicillines
RA	: Résistance Acquise

RN	: Résistance Naturelle
S	: Sensible
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SM	: Spectrométrie de Masse
T	: Thymine
UA	: Unité Arbitraire
UV	: Ultra-Violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Développement de la résistance bactérienne au fil du temps au fur et à mesure de la découverte des antibiotiques. * BMR : Bactéries Multi-Résistantes, **BHRé : Bactéries Hautement Résistantes (Rapport Santé publique France, 2016).....	12
Figure 2. Voies du catabolisme du glucose chez les bactéries lactiques (Drider <i>et al.</i> , 2009).....	17
Figure 3. Arbre phylogénétique des bactéries à Gram+ basé sur la comparaison des séquences de l'ADN 16S (Schleifer et Ludwig, 1995)	19
Figure 4. Histoire de la découverte des bactériocines au fil du temps.....	28
Figure 5. Classification universelle des bactériocines reprise avec quelques modifications. (a) Classification proposée par Klaenhammer (1993), (b) Classification proposée par Cotter <i>et al.</i> , (2005) et (c) Classification proposée par Heng et Tagg (2006).....	31
Figure 6. Classification proposée pour les bactériocines des bactéries lactiques et leur structures (Alvarez-Sieiro <i>et al.</i> , 2016). Les cases grises ont été identifiées <i>in silico</i> . (*bactériocines des bactéries non lactiques)	34
Figure 7. Biosynthèse de la nisine et auto-immunité. Les gènes et les protéines impliqués dans des événements similaires sont mis en évidence avec des couleurs identiques. Les gènes et les protéines de modification sont représentés en rouge, le transport en bleu, le traitement en vert, la régulation de la biosynthèse en orange et l'auto-immunité (cyan). Le pré-peptide de nisine est montré en (gris/noir) alors que la nisine active est noire avec des anneaux de (méthyl) lanthionine indiqués en rouge (Abts <i>et al.</i> , 2013).	36
Figure 8. Modification post-traductionnelle de la nisine (Mavaro <i>et al.</i> , 2011).....	37
Figure 9. Mécanisme de transport et de maturation des pré-bactériocines de la sous-classe IIa possédant un peptide leader (Simon, 2001).....	38
Figure 10. Aperçu schématique du mécanisme proposé pour la production de bactériocines de la classe IIa (Ennahar <i>et al.</i> , 2000).....	39
Figure 11. Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram+ (Fernandez, 2014).....	40
Figure 12. Schéma du test antibactérien direct et indirect.....	52
Figure 13. Concentrateur utilisé pour sécher l'ensemble des bactériocines purifiée dans ce travail....	57
Figure 14. Schéma du protocole utilisé pour la purification des bactériocines	57
Figure 15. Exemple de zones d'inhibition obtenues autour des colonies lors du test antibactérien direct	71
Figure 16. Exemple de zone d'inhibition obtenue autour des spots déposés. Les spots de A à E' correspondent aux extraits de culture de différents isolats testés	72
Figure 17. Effet de la concentration du NaCl sur l'activité antibactérienne.....	75
Figure 18. Effet de la concentration de l'extrait de levure sur sur l'activité antibactérienne.....	75
Figure 19. Effet de la température sur sur l'activité antibactérienne.....	76
Figure 20. Effet du pH initial de culture sur l'activité antibactérienne	76
Figure 21. Cinétique de la production des bactériocines	77
Figure 22. Profil chromatographique de la fraction II après passage en HPLC sur une colonne semi-préparative en phase inverse C8. Détection en UV à 280 nm. Les flèches en rouge indiquent les fractions centrales actives.....	79
Figure 23. Profils chromatographiques des fractions purifiées après passage en HPLC sur une colonne analytique phényl hexyl avec détection en UV à 280 nm à partir de l'extrait de culture d' <i>Enterococcus durans</i> LC2 : (a) fraction A obtenue après élution par le gradient B (b) fraction B1 (c) fraction B2 (d) fraction C1 et (e) fraction C2, obtenues après élution par le gradient A.....	80

Figure 24. Spectres des masses réalisés par ESI-MS des fractions collectées (B1, B2, C1 et C2) après séparation par HPLC	82
Figure 25. Alignement des séquences nucléotidiques de la bactériocine B1 produites par <i>Enterococcus durans</i> LC2 avec celle de l'entérocoque L50A.....	83
Figure 26. Alignement des séquences nucléotidiques de la bactériocine B2 produites par <i>Enterococcus durans</i> LC2 avec celle de l'entérocoque L50B	83
Figure 27. Profil chromatographique de la fraction II après passage sur une colonne semi-préparative en phase inverse C8 avec détection en UV à 280 nm. Les flèches en rouge indiquent les fractions centrales actives.....	86
Figure 28. Profils chromatographiques des trois bactériocines produites par <i>Lactococcus lactis</i> EO24 purifiées après passage sur la colonne phényl hexyl en HPLC phase inverse à 280 nm. (a) fraction A, (b) fraction B obtenues après élution par le gradient B et (c) fraction C, obtenue après élution par le gradient A.....	87
Figure 29. Spectres de masse réalisés par ESI-Q-TOF des fractions collectées (A, B et C) après séparation par HPLC	88
Figure 30. Profil chromatographique de la fraction active obtenue après élution par le gradient A produite par <i>Lactococcus lactis</i> L17 après passage sur la colonne phényl hexyl en HPLC phase inverse avec détection en UV à 280 nm.....	89
Figure 31. Profil chromatographique de la bactériocine produite par <i>Lactobacillus plantarum</i> L3 purifiée sur la colonne phényl hexyl en HPLC phase inverse obtenue après élution par le gradient B. Détection en UV à 280 nm	90
Figure 32. Spectre de masse réalisé par ESI Q-TOF de la fraction collectée après séparation par HPLC	91
Figure 33. Taux de la résistance de l'ensemble des espèces retenues	94
Figure 34. Répartition des BMRe en fonction de l'origine de l'échantillon biologique	94
Figure 35. Identification des germes isolés en fonction de la couleur des colonies obtenues sur milieu sélectif. (a) colonies de <i>Salmonella spp</i> sur milieu Hektoene. (b) colonies d' <i>Enterococcus faecalis</i> sur milieu Brilliance. Colonies de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur milieu Chapman (c) et sur milieu Brilliance (d)	95
Figure 36. Répartition des infections dues aux BMRe selon l'âge.....	97
Figure 37. Répartition des BMRe retenues en fonction de l'espèce.....	97
Figure 38. Exemple d'antibiogramme : (a) <i>Acinetobacter baumannii complex</i> 160189, (b) <i>Klebsiella pneumoniae</i> 290083	98
Figure 39. Taux de résistance des entérobactéries testées vis-à-vis de 23 antibiotiques appartenant à différentes classes.....	100
Figure 40. Taux de résistance des différentes souches d' <i>Escherichia coli</i> testées vis-à-vis de 21 antibiotiques appartenant à différentes classes.....	102
Figure 41. Taux de résistance des deux souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> testées vis-à-vis de 16 antibiotiques appartenant à différentes classes.....	103
Figure 42. Taux de résistance des trois souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> testées vis-à-vis de 10 antibiotiques appartenant à différentes classes.....	104
Figure 43. Taux de résistance des trois souches de <i>Staphylococcus spp</i> testées vis-à-vis de 26 antibiotiques appartenant à différentes classes.....	105
Figure 44. Taux de résistance des trois souches d' <i>Enterococcus faecalis</i> testées vis-à-vis de 18 antibiotiques appartenant à différentes classes.....	106
Figure 45. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la gentamycine vis-à-vis d' <i>Acinetobacter baumannii</i> 280291 via la technique « <i>the spot on the lawn</i> ». Les spots de A à H correspondent à une série de concentrations testées de 120 à 0,93 µg.ml ⁻¹	107

Figure 46. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet des extraits de culture d' <i>Enterococcus durans</i> LC2 et de <i>Lactococcus lactis</i> EO24 via la technique du « spot on the lawn ». Les photos montrent l'effet antibactérien vis-à-vis de trois souches indicatrices : (a) <i>Klebsiella pneumoniae</i> 290083, (b) <i>Salmonella spp</i> 290146 et (c) <i>Enterococcus faecalis</i> 90161.....	109
Figure 47. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la nisine Z purifiée vis-à-vis de l' <i>Enterococcus faecalis</i> 250095. Les spots de A à H correspondent à une série de solutions de 500 à 3,9 µg.ml ⁻¹ . Les deux zones d'inhibition obtenues correspondent aux concentrations 500 (A) et 250 (B) µg.ml ⁻¹	111
Figure 48. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la pédiocine PA-1 purifiée vis-à-vis de l' <i>Enterococcus faecalis</i> 250095. Les spots de A à H correspondent à une série de solutions de 500 à 3,9 µg.ml ⁻¹ . Des zones d'inhibitions ont été obtenues pour toutes les concentrations testées.....	112
Figure 49. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la combinaison nisine A/ pédiocine PA-1. Les spots de A à N correspondent à des séries de solutions de 250/250 à 0,12/0,12 µg.ml ⁻¹ . La dernière zone d'inhibition obtenue correspond à la concentration 0,24/ 0,24 µg.ml ⁻¹ (K) vis-à-vis de l' <i>Enterococcus faecalis</i> 250095 (a) et à la concentration 15,62/ 15,62 µg.ml ⁻¹ (E) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> 400037 (b).....	112
Figure 50. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la bactériocine C1 et C2 seules et en combinaison vis-à-vis de l' <i>Acinetobacter baumannii</i> 280291. (a) Les spots de A à H correspondent à une série de solutions (de la combinaison C1+C2) de 500/500 à 3,9/3,9 µg.ml ⁻¹ , la dernière zone d'inhibition obtenue correspond à la concentration 7,81/7,81 µg.ml ⁻¹ (G) ; (b) les spots déposés correspondent à des dilutions de la solution pure des bactériocines purifiées (B1, B2, C1, C2, EO24, L17 et L3) variant entre 1000 à 500 µg.ml ⁻¹ , les seules zones d'inhibition obtenues correspondent à des CMI de 1000 µg.ml ⁻¹ pour les bactériocine C1 et C2	113
Figure 51. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet des bactériocines C1(a) et C2 (b) seules et en combinaison (c) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> 220015. Les spots de A à H correspondent à une série de solutions de 1000 à 7,8 µg.ml ⁻¹ (a et b) et de 500/500 à 3,9/ 3,9 µg.ml ⁻¹ (c). La dernière zone d'inhibition obtenue correspond à la concentration (F) 31,25 µg.ml ⁻¹ (a), à (E) 62,5 µg.ml ⁻¹ (b) et à (F) 15,62/15,62 µg.ml ⁻¹ (c)	114
Figure 52. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la nisine A (a) et de la pénicilline G (b) seules et en combinaison (c), par la méthode « spot on the lawn » vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> 400037. (a) effet de la nisine à des concentrations allant de 1000 à 0,06 µg.ml ⁻¹ (de A à O) ; les quatre zones d'inhibition obtenues correspondent à des concentrations de A 1000, B 500, C 250 et D 125 µg.ml ⁻¹ . (b) effet de la pénicilline G à des concentrations de 53 à 0,1 µg.ml ⁻¹ (A à H) ; aucune zone d'inhibition n'a été obtenue, (c) effet de la combinaison nisine A/pénicilline G testée à des concentrations de 500 à 62,5 µg.ml ⁻¹ pour la nisine A et de 6,25 à 0,19 µg.ml ⁻¹ pour la pénicilline G (de A à D' '); 12 zones d'inhibitions ont été obtenues; le spot D " correspond à la plus faible concentration obtenue qui est de 62,5 / 0,19 µg.ml ⁻¹ pour la nisine A et la pénicilline G respectivement	117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principaux genres de bactéries lactiques (Collins <i>et al.</i> , 1987 ; Schleifer <i>et al.</i> , 1995 ; Dicks <i>et al.</i> , 1995).....	19
Tableau 2. Différence entre les bactériocines et les antibiotiques (Nes <i>et al.</i> , 2011).....	26
Tableau 3. Classification des bactériocines proposée par Zouhir <i>et al.</i> , 2010	31
Tableau 4. Souches indicatrices utilisées pour détecter l'activité antibactérienne et établir le spectre d'activité des isolats analysés.....	50
Tableau 5. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes de structure des entérocinines L50A et L50B par PCR	59
Tableau 6. Identification des germes en fonction de la couleur des colonies sur milieu sélectif	61
Tableau 7. Classification des huit antibiotiques sélectionnés	62
Tableau 8. Exemple de préparation d'une plaque de titrage d'antibiotiques à partir de la solution mère	63
Tableau 9. Exemple de la préparation d'une plaque de titrage de deux bactériocines pures seules et en combinaison.....	64
Tableau 10. Exemple de la préparation d'une plaque de titrage de la combinaison bactériocine/antibiotique (amoxicilline).....	65
Tableau 11. Concentrations en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des combinaisons antibiotique/bactériocine à partir d'une solution mère à $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de la bactériocine pure.....	66
Tableau 12. Concentrations en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des combinaisons antibiotique/bactériocine à partir d'une solution mère à $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de la bactériocine pure.....	67
Tableau 13. Nature et origine des échantillons alimentaires analysés	69
Tableau 14. Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne à travers les tests antibactériens direct et indirect.....	72
Tableau 15. Spectre d'activité des souches à effet antibactérien reproductible vis-à-vis d'une gamme de souches indicatrices. Les zones d'inhibitions sont exprimées en mm	73
Tableau 16. Identification des souches retenues dotées d'activité antibactérienne.....	74
Tableau 17. Effet de différentes conditions expérimentales sur l'activité antibactérienne mesurée dans l'extrait de culture des souches sélectionnées exprimée en UA/ml.....	77
Tableau 18. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture d' <i>Enterococcus durans</i> LC2	78
Tableau 19. Comparaison des séquences peptidiques obtenues par la dégradation d'Edman et par traduction des séquences nucléotidiques des bactériocines purifiées à partir de la souche <i>Enterococcus durans</i> LC2 par rapport aux entérocinines L50A et L50B natives.....	84
Tableau 20. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture de <i>Lactococcus lactis</i> EO24.....	85
Tableau 21. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture de <i>Lactococcus lactis</i> L17.....	89
Tableau 22. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture de <i>Lactobacillus plantarum</i> L3.....	90
Tableau 23. Comparaison des masses moléculaires de l'ensemble des bactériocines purifiées dans cette étude	92
Tableau 24. Concentrations minimales inhibitrices des deux entérocinines L50A (B1) et L50B (B2) vis-à-vis de souches indicatrices pathogènes d'origine alimentaire.....	93
Tableau 25. Résultats de l'échantillonnage des isolats cliniques	94

Tableau 26. Répartition des BMRe retenues en fonction de la nature du prélèvement, de l'âge et du sexe de patient	96
Tableau 27. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d'entérobactéries (<i>Klebsiella spp</i> , <i>Salmonella spp</i>)	99
Tableau 28. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d'entérobactéries (<i>Escherichia coli</i>)	101
Tableau 29. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d' <i>Acinetobacter spp</i>	102
Tableau 30. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques de <i>Pseudomonas spp</i>	103
Tableau 31. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques de <i>Staphylococcus spp</i>	104
Tableau 32. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d' <i>Enterococcus faecalis</i>	105
Tableau 33. Valeurs des CMI des antibiotiques purs testés vis-à-vis de sept BMRe sélectionnées ..	108
Tableau 34. Activité des extraits de culture des souches LC2 et EO24 contre des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques	110
Tableau 35. Activité des bactériocines B1, B2, C1 et C2 seules, puis en combinaison B1+B2 et C1+C2, activité de la nisine Z purifiée, de la nisine A commerciale, de la pédiocine PA-1 purifiée, de la combinaison nisine A+ pédiocine PA-1 et de la bactériocine EO24/C non identifiée vis-à-vis d'une série de BMRe aux antibiotiques	115
Tableau 36. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 31107 multi-résistante aux antibiotiques	119
Tableau 37. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche de <i>Salmonella spp</i> 290146 multi-résistante aux antibiotiques	120
Tableau 38. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche d' <i>Escherichia coli</i> 500097 multi-résistante aux antibiotiques	121
Tableau 39. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> 280291 multi-résistante aux antibiotiques	122
Tableau 40. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 230173 multi-résistante aux antibiotiques	123
Tableau 41. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis-à-vis de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> 400037 multi-résistante aux antibiotiques	124
Tableau 42. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis-à-vis de la souche d' <i>Enterococcus faecalis</i> 300043 multi-résistante aux antibiotiques	125
Tableau 43. Récapitulatif des masses des bactériocines B1, B2, C1 et C2 obtenues	129

TABLE DES MATIERE

AVANT PROPOS	i
DEDICACE.....	iii
REMERCIEMENTS	v
LISTE DES ABREVIATIONS	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX	xiii
TABLE DES MATIERE	xv
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Les antibiotiques	6
1. Définition.....	6
2. Découverte	6
3. Classification /mécanismes de résistance	7
a. β -lactamines	7
b. Glycopeptides.....	7
c. Aminosides	8
d. Macrolides	8
e. Quinolones	8
4. La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	9
a. Apparition et diffusion de la biorésistance	9
b. Différents types de résistances	12
c. Mécanisme de résistance bactérienne.....	12
5. Quelle alternative ?	13
II. Les bactéries lactiques.....	15
1. Généralités	15
2. Historique	17
3. Taxonomie	18
a. Le genre <i>Lactobacillus</i>	20
b. Le genre <i>Lactococcus</i>	20
c. Le genre <i>Enterococcus</i>	20
4. Habitat.....	21
5. Identification des espèces bactériennes	21
a. Par des techniques usuelles	21

b.	Par spectrométrie de masse.....	22
6.	Utilisation	22
a.	Dans le domaine agroalimentaire	22
b.	Dans le domaine de la santé	23
III.	Les bactériocines	25
1.	Définition.....	25
2.	Historique.....	27
3.	Nomenclature.....	28
4.	Classification.....	28
a.	Classification selon Klaenhammer.....	28
b.	Classification selon Cotter <i>et al.</i> , (2005).....	30
c.	Classification selon Heng et Tag (2006).....	30
d.	Classification selon Alvarez-Sieiro <i>et al.</i> , (2016)	32
5.	Biosynthèse et régulation.....	35
a.	Biosynthèse des petits peptides modifiés post-traductionnellement (Classe I).....	35
b.	Biosynthèse des bactériocines non modifiées (classe II)	37
c.	Biosynthèse des bactériocines de la classe III	39
6.	Mode d'action	40
a.	Classe I.....	40
b.	Classe II.....	41
c.	Classe III.....	42
7.	Facteurs influençant la production de bactériocines.....	42
a.	Température d'incubation et pH initial de culture	43
b.	Composition de milieu de culture	43
c.	Durée d'incubation.....	43
d.	Présence de microorganismes compétitifs	43
8.	Application.....	43
a.	Alimentaire	44
b.	Médicale	45
9.	Etat des lieux et contraintes d'utilisation.....	46
a.	Etat des lieux	46
b.	Contraintes et alternatives d'utilisation.....	46
	CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	48
I.	Echantillonnage	49
II.	Pouvoir antagoniste (test antibactérien)	51

1.	Test antibactérien direct	51
2.	Purification des bactéries	51
3.	Test antibactérien indirect	51
4.	Test de la dilution critique.....	52
5.	Spectre d'activité.....	52
III.	Identification et conservation des bactéries lactiques.....	53
1.	Identification	53
2.	Conservation.....	53
a.	Conservation de courte durée.....	53
b.	Conservation de longue durée	53
IV.	Optimisation de conditions expérimentales pour la production des bactériocines	54
V.	Purification des bactériocines	54
1.	Préparation de l'extrait de culture	54
2.	Purification par passage sur un échangeur de cations.....	55
3.	Purification par passage sur une phase stationnaire inverse (C8/C18/ phényl héxyl).....	56
VI.	Analyse structurale des bactériocines.....	58
1.	Mesure de la masse moléculaire par ESI-Q-TOF	58
2.	Séquençage peptidique par la technique de dégradation d'Edman.....	58
3.	Séquençage nucléotidique	59
VII.	Activité des bactériocines purifiées vis à vis de pathogènes alimentaires (CMI en $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	59
VIII.	Etude de l'activité de différents antimicrobiens (bactériocines purifiées et antibiotiques) vis-à-vis de pathogènes multi-résistants issus de milieux biologiques humains	60
1.	Collecte et identification de bactéries pathogènes d'origine humaine multi-résistantes aux antibiotiques.....	60
2.	Antibiogramme.....	61
3.	Activité des antibiotiques par micro dilutions sur les BMRe sélectionnées	62
4.	Activité des bactériocines purifiées par micro dilutions sur les BMRe sélectionnées	63
5.	Activité des combinaisons bactériocine/antibiotique sur les BMRe sélectionnées.....	64
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION		68
I.	Echantillonnage	69
II.	Pouvoir antagoniste (test antibactérien)	71
1.	Test direct.....	71
2.	Spectre d'activité.....	73
III.	Identification des bactéries lactiques.....	73
IV.	Optimisation des conditions expérimentales pour la production des bactériocines	74

V.	Purification des bactériocines	78
1.	Bactériocines des entérocoques	78
2.	Bactériocines des lactocoques	84
a.	<i>Lactococcus lactis</i> EO24 et LV120.....	84
b.	<i>Lactococcus lactis</i> L17.....	88
3.	Bactériocines des lactobacilles.....	90
VI.	Analyse structurale des bactériocines.....	91
VII.	Activité antibactérienne des peptides B1 et B2 sur des pathogènes alimentaires (CMI en $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	92
VIII.	Activité antibactérienne des bactériocines purifiées vis-à-vis des pathogènes humains.....	93
1.	Collecte et identification de bactéries pathogènes d'origine humaine multi-résistantes aux antibiotiques.....	93
2.	Antibiogramme.....	97
3.	CMI des antibiotiques contre les BMRe sélectionnées	106
4.	Activité des bactériocines purifiées sur les BMRe sélectionnées	109
a.	Activité des extraits de culture des souches productrices de bactériocines	109
b.	CMI des bactériocines purifiées contre les BMRe sélectionnées.....	110
5.	Activité des combinaisons bactériocine/antibiotique sur les BMRe sélectionnées.....	116
	DISCUSSION	126
I.	Les bactériocines des bactéries lactiques	126
II.	Optimisation de la production des bactériocines	126
III.	Purification des bactériocines	127
1.	Protocole de purification.....	127
2.	Souches multi-productrices de bactériocines	128
a.	La souche <i>Enterococcus durans</i> LC2	128
b.	La souche <i>Lactococcus lactis</i> EO24.....	130
3.	Souches mono-productrices de bactériocines	130
c.	La souche <i>Lactococcus lactis</i> L17.....	130
d.	La souche <i>Lactobacillus plantarum</i> L3.....	131
IV.	Activité antibactérienne des bactériocines.....	131
1.	Activité vis-à-vis des pathogènes alimentaires	131
2.	Activité vis-à-vis des pathogènes humains.....	133
a.	La résistance aux antibiotiques	133
b.	Activité antibactérienne des bactériocines seules et en combinaison avec les antibiotiques	135
	CONCLUSION GÉNÉRALE	144

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	149
Résumé français	167
Mots clés : bactéries lactiques, bactériocines, antibiotiques, bactéries multirésistantes aux antibiotiques.	167
Résumé anglais.....	167
Keywords : Lactic acid bacteria, bacteriocins, antibiotics, multi-drug resistant bacteria.	167

INTRODUCTION GENERALE

Au cours du 20^{ème} siècle, la découverte de la pénicilline et le développement de tous les autres antibiotiques a constitué un progrès majeur dans l'histoire de la médecine. Leur efficacité dans le traitement des maladies infectieuses a permis de faire chuter le taux de mortalité causé par ces dernières. Cependant, cette "victoire" contre des maladies, le plus souvent mortelles, n'a pas duré longtemps en raison de l'utilisation abusive et excessive des antibiotiques. Ceci a inévitablement conduit à l'émergence du phénomène d'antibio-résistance, qui atteint désormais des niveaux dangereusement élevés dans toutes les régions du monde. Ainsi, pour un nombre croissant d'infections, comme la pneumonie, la tuberculose, la septicémie et la gonorrhée, le traitement devient plus difficile, voire impossible parfois, du fait de la perte d'efficacité des antibiotiques (OMS, 2016). Dans les pays où ces derniers sont très souvent délivrés sans ordonnance, le problème de l'apparition et de la propagation de la résistance des bactéries est encore plus grave avec une augmentation du nombre d'infections à un rythme alarmant.

Face à l'ampleur de ce problème, plusieurs plans d'actions sont menés. D'une part, il y a des actions de prévention et de sensibilisation aussi bien au niveau individuel que collectif (citoyens, responsables politiques, professionnels de santé...). D'autre part, il y a la recherche de nouveaux composés antimicrobiens afin d'identifier des moyens alternatifs de combattre les infections et/ou de réduire la résistance bactérienne. Parmi ces composés, on trouve entre autres ceux sécrétés par les bactéries lactiques et nommés « bactériocines ».

Les bactéries lactiques forment un groupe de bactéries bénéfiques pour l'homme. Ce sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitats. Le point commun qui caractérise ce groupe est la production d'acide lactique qui leur permet d'être utilisées depuis très longtemps dans la fermentation des produits alimentaires. Sur le plan hygiénique, elles freinent le développement des bactéries pathogènes responsable de la détérioration de l'aliment (Benkerroum et Tamime 2004), améliorant ainsi sa conservation, par l'abaissement du pH (Piard & Desmazeaud, 1991; Dortu & Thonart, 2009 ; Moraes *et al.*, 2010). Cette bio-conservation des aliments est une conservation naturelle qui permet de préserver les qualités organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment, sans recours aux conservateurs chimiques (Gálvez *et al.*, 2007; Settanni & Corsetti, 2008). Dans le domaine de la santé humaine, l'intérêt des bactéries lactiques a été suggéré en 1907 par le Russe **Metchnikoff** qui a montré que certaines souches de *Lactobacillus* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en améliorant les propriétés de sa propre flore. Par ailleurs, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques, leurs bienfaits sur la santé humaine ont été démontrés par de nombreuses études ces dernières décennies. L'une des propriétés majeures

d'intérêt des bactéries lactiques dans le domaine alimentaire et médical est liée à leur capacité à synthétiser des molécules à action bactéricide et/ou bactériostatique (Brul et Coote, 1999), comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et les bactériocines (De Vuyst et Vandamme 1994).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens qui permettent l'inhibition de la croissance d'espèces proches de la souche productrice et parfois d'espèces plus éloignées. Il existe différentes classes de bactériocines qui diffèrent notamment par leur taille, leur mode d'action et leur cible microbienne. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables (Tagg *et al.*, 1976). Elles présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Actuellement, seule la nisine est autorisée dans une utilisation commerciale, mais uniquement en industrie alimentaire. Cependant, depuis quelques années le potentiel thérapeutique des bactériocines dans la médecine humaine et vétérinaire a été démontré. Ainsi, certaines études ont montré un effet positif des bactériocines dans le traitement de certaines maladies de la peau (Bonelli *et al.*, 2006), de la carie dentaire (Jett *et al.*, 1990) ou encore de certaines infections de la gorge (Tagg *et al.*, 2004).

L'intérêt des bactériocines réside dans le fait qu'elles possèdent un mécanisme d'action différent de celui des antibiotiques conventionnels. En effet, ces derniers sont pour la plupart des molécules naturelles, de différentes natures chimiques, synthétisées essentiellement par des champignons, alors que les bactériocines sont des peptides produits par les bactéries. Théoriquement, les bactéries résistantes aux antibiotiques ne devraient pas être résistantes aux bactériocines puisque les deux groupes de molécules n'ont pas le même mécanisme d'action (Mathieu, 2013). En effet, les antibiotiques ont des mécanismes d'actions variables en fonction de leurs origines diverses. Certains inhibent la synthèse de la paroi bactérienne ou perturbent le fonctionnement de la membrane cellulaire, d'autres inhibent la synthèse des acides nucléiques ou encore la synthèse protéique (Sass *et al.*, 2008). Quant aux bactériocines, la majorité des travaux indiquent que leur siège d'activité est la membrane cellulaire, où leur action se traduit par la formation de pores et par un déséquilibre de la perméabilité membranaire, d'où la perte de la Force Proton Motrice (FPM) (Braun *et al.*, 1994 ; Montville et Chen, 1998; Ennahar *et al.*, 2000). Or, cette FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne. Il en résulte un arrêt rapide de l'activité cellulaire et donc la mort de la cellule cible. Ce mécanisme d'action différent permettrait ainsi, aux bactériocines de déjouer les mécanismes de résistance développés par les bactéries vis-à-vis des antibiotiques et d'être

de bons candidats pour remplacer et/ou potentialiser l'activité des antibiotiques impliqués dans le traitement des infections (Dicks *et al.*, 2011).

Ainsi, afin de contrer le problème de l'antibio-résistance, la recherche de nouvelles approches permettant l'émergence de traitements nouveaux et efficaces est devenue une priorité majeure. L'exploration de la biodiversité microbienne et la mise au point de nouvelles méthodes de détection et d'optimisation du potentiel antimicrobien de souches bactériennes, notamment des bactéries lactiques, constitue l'une des voies de recherche possibles.

Dans ce travail, nous avons procédé, dans un premier temps, au criblage d'un grand nombre de souches de bactéries lactiques, issues de différents biotopes naturels, ayant la capacité de produire des bactériocines. Par la suite, nous avons caractérisé ces métabolites et mis en évidence leur activité antimicrobienne vis-à-vis des souches pathogènes.

Cette thèse, avait donc pour objectifs :

- L'isolement de bactéries lactiques dotées d'activité antibactérienne à partir de différents biotopes marocains ;
- L'identification et la caractérisation de nouvelles bactériocines issues de bactéries lactiques sélectionnées ;
- Le criblage de bactéries pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques issues de liquides biologiques humains ;
- L'étude de l'activité des bactériocines purifiées, seules ou en combinaison avec des antibiotiques vis-à-vis de bactéries multi-résistantes sélectionnées.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les antibiotiques

1. Définition

Les antibiotiques sont des molécules chimiques à effet antimicrobien. Ils sont élaborés par une large gamme de micro-organismes fongiques et bactériens ou à partir de produits de synthèse. Par ailleurs, plusieurs antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire afin d'améliorer certaines de leurs propriétés physicochimiques ou biologiques, il s'agit des antibiotiques semi-synthétiques (Madigan et Martinko, 2007).

2. Découverte

La découverte des antibiotiques est attribuée officiellement à **Sir Alexander Fleming**, qui a découvert la pénicilline « premier antibiotique » en 1928, par hasard, chez le champignon *Penicillium notatum*. Or, leur histoire remonte à un passé plus lointain. En effet, les premiers à avoir étudié les effets de certaines moisissures ainsi que les phénomènes de compétition entre les micro-organismes, ont été **Louis Pasteur** en collaboration avec le physicien **Jules Joubert**. Ils ont observé que la croissance d'une colonie de bacilles dans un bouillon à base d'urine stérile avait été inhibée par l'ajout de certains microorganismes aérobies. En 1877, Pasteur et Joubert ont observé que les cultures du bacille du charbon (*Bacillus anthracis*) ont été inhibées lorsqu'elles ont été contaminées par des moisissures. Ensuite, en 1897, **Ernest Duchesne** (médecin français) a présenté une thèse de doctorat intitulée "Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes : antagonisme entre les moisissures et les microbes" ; où il a démontré l'interaction entre la bactérie *Escherichia coli* et la moisissure *Penicillium glaucum*. Enfin, il a fallu attendre près de trente ans pour que ces propriétés soient redécouvertes par hasard en 1928 par Sir Alexander Fleming (Papp Desiderio, 1954). Il s'aperçut que certaines de ses cultures bactériennes (colonies de staphylocoques) avaient été contaminées par un champignon microscopique, *Penicillium notatum*. Ce qui a attiré l'attention de Fleming était le changement imprévu provoqué par le champignon ; apparition de zones claires dans les colonies de staphylocoques. Ceci a orienté Fleming vers l'émission d'une hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon était responsable de ce phénomène et lui donna le nom de pénicilline. Il venait de découvrir le premier des antibiotiques (Papp Desiderio, 1954). Mais c'est seulement en 1939 que Howard Walter FLOREY, pathologiste britannique, et Ernst Boris CHAIN, biochimiste et pathologiste, ont réussi à isoler le principe actif, la pénicilline. En 1945, les trois chercheurs (Fleming, Florey et Chain) obtinrent le prix

Nobel de médecine pour leurs contributions à la mise au point du traitement antibiotique par la pénicilline (Chain *et al.*, 1940).

3. Classification /mécanismes de résistance

La classification des antibiotiques peut se faire selon l'origine du microorganisme producteur, selon le mode d'action (paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques), selon le spectre d'activité (étroit ou large) ou bien selon la nature chimique qui est très variable (Talbert, *et al.*, 2009).

Nous adopterons dans ce travail la classification - en fonction de la structure chimique - selon laquelle les antibiotiques se répartissent en cinq grandes familles :

a. β -lactamines

Les bêta-lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibiothérapie. Elles possèdent toutes un noyau azétidine nitré à quatre sommets qui correspond à la partie efficace de la molécule. Ces antibiotiques agissent de l'extérieur de la cellule bactérienne, en se fixant sur les protéines membranaires de la cellule cible. Dans un premier temps, les lactames doivent franchir la paroi bactérienne, pour aller se fixer sur des protéines cibles de la membrane plasmique appelées PLP : protéines liant les pénicillines. Ces dernières sont en fait des enzymes, transpeptidases, transglycosylases et carboxypeptidases, impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. La fixation des bêta-lactamines sur les PLP inhibe le fonctionnement enzymatique bloquant ainsi la synthèse du peptidoglycane (Laurent, 2009 ; Archambaud, 2009).

b. Glycopeptides

Tout comme les bêta-lactamines, les antibiotiques de cette famille attaquent le constituant principal de la paroi bactérienne : le peptidoglycane. Le mécanisme d'action est néanmoins différent. Les antibiotiques se fixent sur les extrémités des précurseurs du peptidoglycane, empêchant par encombrement stérique, le branchement au peptidoglycane et donc son élongation. En inhibant ainsi la synthèse du peptidoglycane, ils inhibent la croissance bactérienne (Mouton, *et al.*, 2000). Ils n'agissent que sur les bactéries à Gram positif. Les antibiotiques de cette famille sont utilisés exclusivement en milieu hospitalier. Il s'agit du téicoplanine et de la vancomycine.

c. Aminosides

Leur cible est le ribosome. Après avoir traversé la paroi bactérienne et la membrane plasmique, les aminosides ciblent l'ARN de la petite sous-unité 30S du ribosome, au niveau du site où l'ARN messager est décodé. Ils agissent en provoquant des erreurs de lecture de l'ARN messager, ce qui engendre une perturbation de la synthèse des protéines membranaires.

Les aminosides sont composés de sucres portant des fonctions amine. Les principales molécules de cette famille sont : streptomycine, gentamycine, netilmicine, tobramycine, amikacine. Elles ont un large spectre bactéricide et sont le plus souvent utilisées en combinaison avec d'autres antibiotiques, comme les β -lactamines, dans le cas d'infections nosocomiales sévères (Archambaud, 2009).

d. Macrolides

Les macrolides sont constitués par un macrocycle souvent associé à des sucres neutres ou aminés. Ils ciblent le site catalytique du ribosome bactérien au niveau de la sous-unité 50S et empêchent ainsi la synthèse de la liaison peptidique. La réplication, la duplication et donc la division cellulaire bactérienne sont ainsi bloquées. L'érythromycine est le plus connu des macrolides.

Du fait que, les macrolides ont la capacité de diffuser dans les tissus et sont actifs sur les germes intracellulaires, ils sont utilisés dans le cas des infections pulmonaires atypiques (légionellose, infection à *Chlamydia*), dans certaines infections à streptocoques, à entérocoques et aux *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline SARM (Madigan et Martinko, 2007).

e. Quinolones

Les quinolones sont des bactéricides à large spectre, leur activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram- se traduit par la formation de complexes avec les ADN topoisomérases II impliquées dans les mécanismes de modulation de la topologie de l'ADN au cours de la réplication. L'inhibition de l'activité enzymatique conduit à la mort cellulaire. Leur *activité* vis-à-vis des bactéries à Gram+ semble passer par le blocage de l'activité des topoisomérase IV (Kohanski *et al.*, 2010).

Les quinolones et leurs dérivés plus récents les fluoroquinolones sont des molécules dérivées de l'acide nalidixique :

- 1^{ère} génération (utilisées essentiellement contre les entérobactéries) : acide pipémidique, acide nalidixique ;
- 2^{ème} génération (utilisées contre les infections urinaires), les fluoroquinolones : norfloxacin, loméfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacine ;
- 3^{ème} et 4^{ème} génération (anti-pneumococciques) : lévofloxacin, moxifloxacin, gémifloxacin, sparfloxacin.

Ils sont très efficaces contre les bactéries à Gram- comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et contre *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que les bactéries à Gram+ telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis* (Prescott, *et al.*, 2007).

4. La résistance bactérienne aux antibiotiques

a. Apparition et diffusion de la biorésistance

Les antibiotiques ont permis de faire reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses de façon considérable au cours du 20^{ème} siècle. Depuis la découverte de la pénicilline par A. Flemming et la mise en évidence de son effet antibactérien *in vivo* par E. Chain et HW. Florey (Desiderio, 1954), leur utilisation en thérapie humaine a démarré et n'a depuis cessé d'augmenter. En effet, depuis les années 1940, l'avènement des antibiotiques a constitué une révolution thérapeutique cruciale. Ainsi, il était devenu possible de combattre des maladies jusqu'alors impossible à guérir et dont la prévalence était souvent, voire toujours, mortelle ; telle que la tuberculose et les méningites bactériennes (Lode, 2010).

Cependant, dès le début de l'antibiothérapie, le problème de la persistance de l'efficacité des molécules s'est posé. Alexander Fleming, lui-même avait pressenti et prédit l'émergence du phénomène de la résistance bactérienne lors de son discours de remise de prix Nobel en 1945 : "...Mais je voudrais tirer la sonnette d'alarme : La pénicilline n'est pas toxique, il n'y a donc pas lieu de s'inquiéter de l'empoisonnement du patient. Il peut exister un danger, cependant, en cas de sous-dosage, il n'est pas difficile de rendre les microbes résistants à la pénicilline en laboratoire en les exposant à des concentrations insuffisantes pour les tuer, et la même chose s'est parfois produite dans le corps...".

D'ailleurs, dès 1944 les premières résistances à la pénicilline avaient été rapportées (Alexander et Redman 1944). En 1948, le phénomène de résistance de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline, notamment dans les hôpitaux de Londres, a été décrit avec un taux passant de

14% en 1946 à 59% en 1948 (Barber, 1948). Il en a été de même pour d'autres antibiotiques, quelques années à peine après leurs mises sur le marché. Ainsi, pour le chloramphénicol, les dates de mise sur le marché et d'apparition de la résistance ont été respectivement de 1947 et 1959 ; pour la tétracycline, 1948 et 1953 ; pour l'érythromycine, 1952 et 1988 ; pour la vancomycine, 1956 et 1988 (Palumbi, 2001). Un aperçu de cette évolution est schématisé à la **figure 1**.

En fait, ce phénomène n'a fait que s'amplifier au cours des 50 dernières années, par un usage excessif et irraisonné des antibiotiques. En effet, au niveau mondial, la consommation globale des antibiotiques a augmenté de 65% entre 2000 et 2015, passant de 21,1 milliards de doses quotidiennes à 34,8 milliards de doses (Eili, 2015). Si ces augmentations - enregistrées essentiellement dans les pays émergents - ont permis l'accès du plus grand nombre à des traitements pour des maladies classiques, elles constituent toutefois un risque majeur pour davantage de biorésistance. De plus, l'industrie pharmaceutique, en développant et en mettant sur le marché de nouvelles molécules pour pallier chaque nouvelle émergence a contribué à l'apparition de souches « super résistantes / multirésistantes ». Il devient alors de plus en plus difficile, voire impossible, de les combattre avec les différents traitements disponibles. Certaines infections, mortelles pour l'homme, ayant été complètement éradiquées, refont leur apparition, en raison de l'inefficacité des antibiotiques classiques, c'est le cas notamment de la tuberculose, de la syphilis, de la gonorrhée et du choléra. Dans les pays où les antibiotiques sont très souvent délivrés sans ordonnance, le problème de l'apparition et de la propagation de la biorésistance est encore plus grave avec une augmentation du nombre d'infections à un rythme alarmant (Weiss, 2002).

Au Maroc, différentes études réalisées dans des structures hospitalières et universitaires confirment cette évolution. En effet, un suivi épidémiologique réalisé entre 2006 et 2008 a montré que le taux de résistance chez les SARM, était passé de 64 à 76% pour l'érythromycine, la gentamycine, l'acide fusidique, les fluoroquinolones et le cotrimoxazole (Benouda *et al.*, 2009). De même Figuigui *et al.*, (2013) ont décrit un taux de résistance de 89% pour les fluoroquinolones, de 94% pour le sulfaméthoxazole + triméthoprim et de 47% pour la gentamycine aussi bien chez *Escherichia coli* que *Klebsiella pneumoniae*. Plus récemment, Mrich *et al.*, (2018) ont rapporté que le taux de résistance chez *Escherichia coli* était passé entre 2015 et 2017, de 65,80% à 93,89% vis-à-vis de la ciprofloxacine, chez *Klebsiella pneumoniae* de 79,13% à 92,27% vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération C3G et de 48,63% à 56,83% vis-à-vis de l'imipénème chez *Acinetobacter baumannii*.

Ce qui ressort par ailleurs de ces différentes études, est que les bactéries multi-résistantes BMRe les plus virulentes sont : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus aureus*. En Europe également, la comparaison de l'émergence des BMRe dans 30 pays, a permis de cibler sept espèces bactériennes du fait de leur taux très élevée de résistance. Il s'agit de : *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ce travail a été, et continue d'être supervisé par le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (CEPCM, 2017). D'ailleurs au niveau mondial, l'OMS a publié une liste « d'agents pathogènes prioritaires » pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques. Cette liste a classé les BMRe en trois catégories, en fonction de leur degré de gravité. A savoir, une première « critique » qui englobe *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes, ainsi que les entérobactéries. Une deuxième catégorie « élevée » comprenant *Enterococcus faecium* résistante à la vancomycine, *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline et *Salmonella* résistante aux fluoroquinolones. Finalement, une troisième classe « moyenne » correspondant, entre autres à *Streptococcus pneumoniae*, insensible à la pénicilline.

La prise de conscience de la gravité de ce phénomène en Europe a amené depuis deux décennies à la mise en place de systèmes de prévention et de sensibilisation, notamment par l'interdiction de la prescription automatique des antibiotiques. Ceci a permis, entre 2006 et 2016, une réduction notable du taux de consommation, de l'ordre de 46% en France et de 24% pour l'ensemble des pays participants au réseau EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System). Ainsi, le taux de résistance aux C3G chez *Escherichia coli* est passé de 14,9 % à 1% en France et à 6% dans les pays du Nord de l'Europe. De même, pour *Klebsiella pneumoniae*, le taux de résistante aux C3G est passé de 6% à moins de 5 % en France entre 2007 et 2017. Globalement, les proportions moyennes de résistance des BHRe (Bactéries Hautement Résistantes) rapportées, au niveau des 30 pays participants au réseau de surveillance ont été seulement de 7,2 % chez *Klebsiella pneumoniae*, 0,1 % chez *Escherichia coli* et 14,9 % chez *Enterococcus faecium* vis-à-vis des C3G (EARSS, 2017).

Mais malgré ces avancées enregistrées essentiellement en Europe, l'antibiorésistance continue, selon l'OMS et différentes organisations internationales et gouvernementales, de constituer un des plus grands défis sanitaires du 21^{ème} siècle. Le rapport, O'Neill (2016), a d'ailleurs chiffré à 10 millions le nombre de décès annuels liés à la résistance aux antibiotiques à l'horizon 2050.

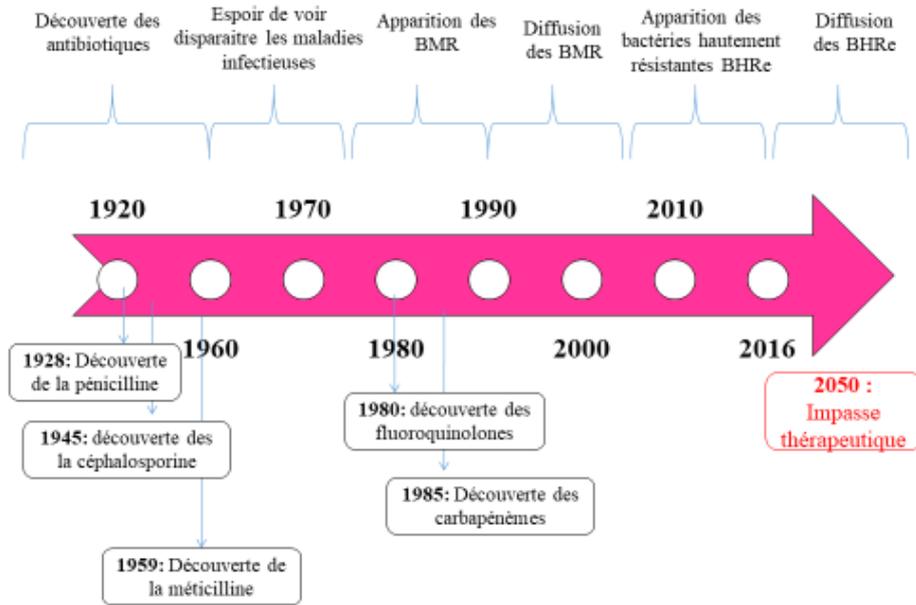


Figure 1. Développement de la résistance bactérienne au fil du temps au fur et à mesure de la découverte des antibiotiques. * BMR : Bactéries Multi-Résistantes, **BHR : Bactéries Hautement Résistantes (Rapport Santé publique France, 2016)

b. Différents types de résistances

Il existe deux types de résistances (Neuman, 1979 ; Acar, 1998) :

- **Résistance naturelle** : dite aussi innée, c'est un caractère qui englobe toutes les souches de la même espèce de façon naturelle.
- **Résistance acquise** : la résistance dans ce cas apparaît chez quelques souches d'une espèce notamment sensible. L'acquisition d'une résistance vis-à-vis des antibiotiques résulte généralement d'un mécanisme biochimique d'origine génétique lié soit à une mutation chromosomique soit à l'acquisition d'un ou plusieurs gènes qui rendent la bactérie insensible à l'antibiotique. Ces gènes de résistance sont le plus souvent transmissibles, d'une espèce à l'autre par différents processus de transfert ; plasmide, transposons ou intégrons (Grundmann *et al.*, 2017).

c. Mécanisme de résistance bactérienne

Dans la mesure où les modes d'action et les cibles moléculaires sont différents d'une famille d'antibiotiques à une autre, les mécanismes de résistance bactérienne le sont également. Ainsi, les bactéries peuvent résister par différents moyens :

- **Production d'enzymes** : Par ce biais, les bactéries sont capables d'inactiver l'action des antibiotiques, bien avant qu'ils ne pénètrent dans la cellule. Ce sont notamment les classes des lactamines, macrolides et aminosides qui sont la cible de ce mécanisme (Babic *et al.*, 2006). Les enzymes produites sont codées à partir d'ADN plasmidique ou chromosomique.
- **Modification de la cible moléculaire** de l'antibiotique, empêchant ce dernier de se fixer et d'agir. Phénomène décrit notamment chez certaines souches de *Streptococcus pneumoniae*. En altérant les PLP : Protéines Liant les Pénicillines, elles modifient l'affinité avec l'antibiotique et l'empêchent d'adhérer à la membrane plasmique.
- **Excrétion active de l'antibiotique par les pompes membranaires** : C'est le principal mécanisme de résistance notamment à la tétracycline aussi bien par les bactéries à Gram⁺ qu'à Gram⁻.
- **Réduction de la perméabilité membranaire** : Pour pénétrer à l'intérieur de la cellule, beaucoup d'antibiotiques empruntent les systèmes de transport spécifiques aux bactéries (Marchou *et al.*, 1987). Ces dernières, résistent en diminuant la perméabilité de leur membrane. Chez les Gram⁻, cette réaction a lieu essentiellement au niveau de la membrane externe, et passe soit par une altération des porines soit par une altération de la composition des lipopolysaccharides (LPS). Chez les bactéries à Gram⁺ ; la résistance se fait à travers une inhibition du transport actif et/ou en empêchant l'accès aux peptidoglycanes.

5. Quelle alternative ?

Pendant plusieurs années, afin de contrer l'émergence de la biorésistance, l'industrie pharmaceutique a fabriqué et mis sur le marché de nouvelles molécules. Ainsi, dès les années 60, la résistance à la pénicilline a été compensée par la mise au point d'une nouvelle molécule nommée initialement pénicilline de classe M, puis plus tard méticilline. Elle a été décrite comme non hydrolysable par la pénicillinase de *Staphylococcus aureus* (Rolinson *et al.*, 1960). Mais, à peine quelques années plus tard, la résistance à la méticilline a été rapportée chez certaines souches de *Staphylococcus aureus* (SARM).

Cette biorésistance récurrente, a entraîné pour les industries pharmaceutiques, une augmentation des coûts pour le développement de nouvelles molécules, rendant cette voie de recherche peu rentable financièrement. Dès lors, certains laboratoires ont privilégié

l'investissement dans le développement de médicaments à prescrire sur de longues périodes (maladies cardio-vasculaires, cholestérol, diabète...), plus rentables financièrement que de nouveaux agents antimicrobiens utilisés seulement pendant quelques jours et susceptibles de devenir rapidement inefficaces. Ainsi, la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques s'est réduite progressivement, et cette réduction s'est poursuivie régulièrement de 1980 à 2000 (Bush, 2004). D'ailleurs, la plupart des classes d'antibiotiques a été découverte avant 1962, et la dernière mise sur le marché d'antibiotiques issus d'une nouvelle famille, non décrite auparavant est antérieure à 1980. Toutes les innovations ultérieures concernent essentiellement la combinaison de molécules préexistantes ou leurs modifications chimiques (Powers, 2004).

Conscientes de la grave crise que constituent la biorésistance et l'émergence de souches hautement pathogènes et multirésistantes, plusieurs organisations internationales (OMS, CDC, CEPCM, World Alliance Against Antibiotic Resistance....) sont de plus en plus mobilisées pour lutter contre les mauvais usages des antibiotiques, leur utilisation abusive dans les élevages notamment et pour la mise en place de procédures efficaces de vigilance, de prévention et de contrôle (Spellberg *et al.*, 2008 ; Roca *et al.*, 2015 ; Carlet, 2015).

Parallèlement, des efforts sont déployés afin d'étudier et de développer de nouvelles approches permettant l'émergence de traitements nouveaux et efficaces, qui serviront à compléter ou à remplacer l'utilisation des antibiotiques conventionnels. Parmi ces voies, la recherche de nouveaux agents anti-infectieux à travers l'exploration de la biodiversité microbienne. Plusieurs programmes sont lancés afin de mettre au point de nouvelles méthodes d'exploration et de valorisation du potentiel antimicrobien des souches bactériennes, et notamment celles des bactéries lactiques.

Parmi les substances à potentiel anti-microbien secrétées par les bactéries lactiques, il y a les bactériocines. Il s'agit de peptides ou de complexes de peptides possédant une activité antimicrobienne. L'innocuité des bactériocines et leur mode d'action qui diffère de celui des antibiotiques conventionnels, font que leur utilisation comme alternatives à ces derniers dans la prévention et/ou le traitement de l'antibiorésistance est de plus en plus d'actualité (Dicks *et al.*, 2011).

II. Les bactéries lactiques

1. Généralités

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes autonomes et procaryotes (Doleyeres *et al.*, 2002), elles ont un caractère commun qui est la production de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme en fermentant le lactose (Kandler & Weiss, 1986). De plus, elles sont connues pour leur capacité à fermenter et à coaguler le lait. Les bactéries lactiques sont à Gram positif, peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (Klein *et al.*, 1998; Badis, *et al.*, 2005). Elles sont anaérobies, asporulées, catalase et oxydase négative et sont partiellement tolérantes à l'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (Larpen *et al.*, 1997 ; Bourgeois *et al.*, 1996). Les bactéries lactiques survivent dans un milieu à faible activité d'eau (Aw) et résistent à l'éthanol (10 – 15 % éthanol) et au CO₂ (Larpen *et al.*, 1997 ; Bourgeois *et al.*, 1996).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en termes d'acides aminés, de vitamines, de sels, d'acides gras, de bases puriques et pyrimidiques et de glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Prescott *et al.*, 1999). Elles tolèrent des pH acides ; pH = 5 et parfois moins. À ces pH, et à plus forte raison à des pH inférieurs, beaucoup de bactéries ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agroalimentaire pour empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes.

Les bactéries lactiques convertissent le pyruvate en acide lactique suite à la fermentation des glucides (Ait Belghanaoui, 2006), tout en générant le NAD⁺ utilisé dans la glycolyse. Ces molécules sont mobilisées pour la production de l'énergie nécessaire à la biosynthèse et la multiplication cellulaire.

Cette transformation génère une ou deux molécules d'ATP, en fonction de la voie métabolique suivie ; homo ou hétérolactique (**Figure 2**) :

- **Voie Embden-Meyerhoff- Parnas, (EMP) (homofermentation)** : L'acide lactique est le principal ou le seul produit du métabolisme excrété à partir du substrat (Larpen-Gourgaud *et al.*, 1997). Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). D'autres sucres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides,

disaccharides ou encore hexitols. Les micro-organismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90% des produits de fermentation (Thomas *et al.*, 1979). La voie EMP est caractérisée par la présence de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA). Cette enzyme est indispensable au fonctionnement de la voie EMP. Elle catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à deux molécules à 3 carbones, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP). C'est une enzyme clé, présente chez toutes les espèces homofermentaires. Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de *Lactocoques*, *Pédiocoques*, ainsi que certains *Lactobacilles* (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996).

- **Voie de Dickens-Horecker (hétérofermentation) :** Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires (Vandamme *et al.*, 1996). Contrairement aux espèces homofermentaires, elles sont dépourvues de la FBA ainsi que de la triose-phosphate isomérase (TPI). Dans ces conditions, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif puis subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase (GLK) ATP-dépendante. Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Ce dernier est scindé en acétyl-phosphate et en glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) par la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique à la voie hétérofermentaire. L'acétyl-phosphate est ensuite converti en éthanol ou en acétate alors que le GAP rejoint la voie de la glycolyse où il est métabolisé en acide lactique. Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'une seule molécule d'ATP. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostocs* et certains *Lactobacilles*.
- **Voie bifide (ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase FPC) :** c'est la voie empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*. C'est une alternative à la glycolyse avec une finalité plus anabolique que catabolique. Elle permet entre autres la production d'érythrose-4-phosphate. Pour une molécule d'hexose consommée, cette voie produit 1,5 molécules d'acétate et 2,5 molécules d'ATP (Drider *et al.*, 2009).

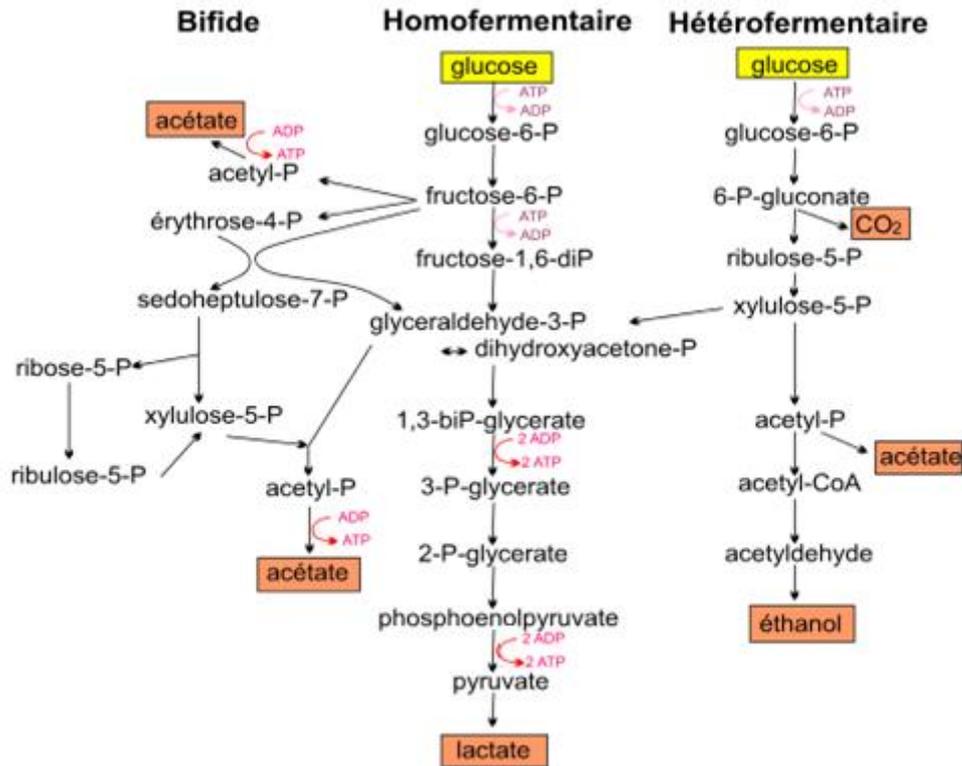


Figure 2. Voies du catabolisme du glucose chez les bactéries lactiques (Drider *et al.*, 2009)

2. Historique

Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant JC au Moyen Orient. Ce qui signifie que, l'utilisation de la fermentation par l'Homme remonte à des temps très anciens. En effet, les premiers produits fermentés ont certainement été obtenus par acidification spontanée des jus végétaux (vins, bières...) ou par contamination naturelle du lait (yaourts, fromages...) (Cooke *et al.*, 1987 ; Girard, 1994 ; Damelin, 1995 ; Ben Omar *et al.*, 2000).

Chez les Égyptiens, la fermentation des végétaux et la production de levain apparaissent entre 4000 et 2000 avant JC. Elle a été réalisée sur des végétaux (concombres, betteraves, dattes, jus de fruits, soja, *etc.*), des produits animaux (viande, lait) et sur des poissons. Cette fermentation avait montré non seulement sa capacité à conserver les aliments, mais aussi à leur donner une saveur différente du produit original (Sherwood, 1939 ; Galeslot, 1950 ; Girard, 1994 ; Damelin *et al.*, 1995).

Les travaux de Pasteur sur la fermentation (1857) ont mis en évidence le lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure était d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par **Joseph Lister** en 1873. Puis, **Metchnikoff** a isolé en 1904 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* présent dans le yaourt. Ses travaux ont porté sur l'étude des propriétés acidifiantes des bactéries lactiques du yaourt. C'est lui qui a développé l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ; notamment les lactobacilles avaient un effet bénéfique sur la santé (Metchnikoff, 1907), et pouvaient ainsi, être introduites dans le régime alimentaire.

3. Taxonomie

Selon la seconde édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (Vos *et al.*, 2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Actuellement, d'un point de vue technologique, les bactéries lactiques regroupent douze genres bactériens différents (**Tableau 1**), il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (Vandamme *et al.*, 1996 ; Axelsson, 2004). L'appellation bactéries lactiques est aussi souvent étendue aux genres *Bifidobacterium*, *Macrococcus*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* qui leur sont apparentés et qui sont également utilisées dans la fabrication de divers produits fermentés (Klaenhammer *et al.*, 2005 ; Pfeiler & Klaenhammer, 2007).

En fait, la première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla-Jensen**. Elle était basée sur leurs propriétés morphologiques et biochimiques : Coloration de Gram, fermentation des sucres, croissance à différentes températures, à différentes concentrations de NaCl, la tolérance aux conditions acides et alcalines.... L'apport de nouvelles approches de taxonomie bactérienne (physiologie, génétique), a permis d'affiner cette classification (Schleifer, 1987 ; Vandamme *et al.*, 1996). Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie désormais sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ADN16S et 23S. Sur la base de ces données, les bactéries à Gram+ forment deux embranchements (**Figure 3**). Un embranchement composé de bactéries à Gram+ avec un pourcentage G+C inférieur à 50%

(Clostridium) et une autre forme de bactéries ayant une teneur en G+C supérieure à 50% (Actinomycètes) (Holzapfel *et al.*, 2001 ; Gevers, 2002). Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G+C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (Vandamme *et al.*, 1996). Il y a peu de corrélation entre la classification traditionnelle et la parenté phylogénétique des bactéries lactiques. Des genres morphologiquement distincts, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont phylogénétiquement entremêlés (Schleifer et Ludwig, 1996 ; Gevers, 2002).

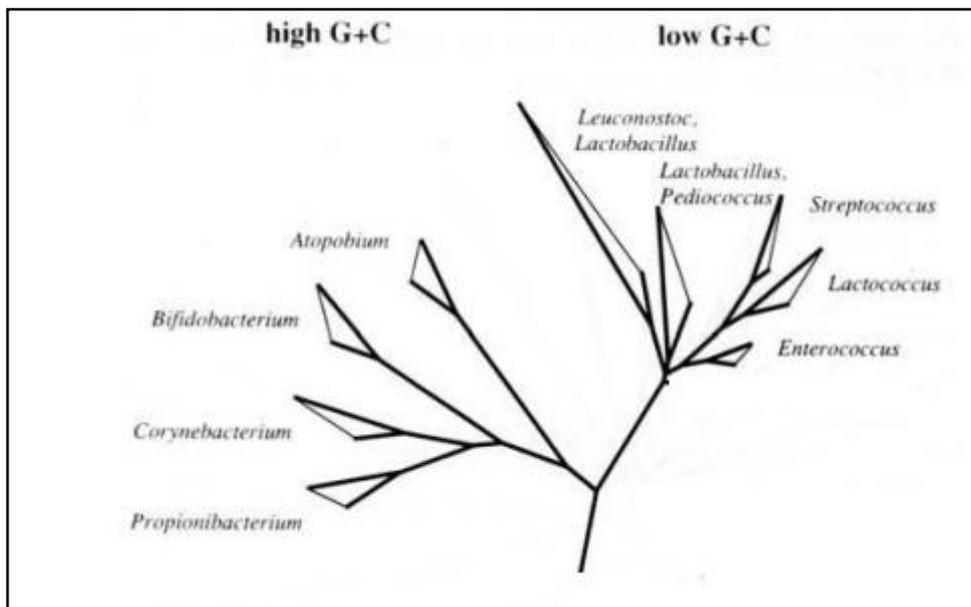


Figure 3. Arbre phylogénétique des bactéries à Gram+ basé sur la comparaison des séquences de l'ADN 16S (Schleifer et Ludwig, 1995)

En outre, il est à signaler que le nombre d'espèces lactiques d'origine alimentaire ne cesse d'augmenter. Ainsi, deux nouvelles espèces lactiques ont été isolées à partir de la viande, il s'agit de *Lactobacillus versmoldensis* (Krockel *et al.*, 2003) et *Vagococcus carniphilus* (Shewmaker *et al.*, 2004). Ces deux espèces ont été respectivement isolées du saucisson cru et de la viande hachée. Parallèlement, *Carnobacterium piscicola* a été reclassée comme *Carnobacterium maltaromaticum* (Mora *et al.*, 2003).

Tableau 1. Principaux genres de bactéries lactiques (Collins *et al.*, 1987 ; Schleifer *et al.*, 1995 ; Dicks *et al.*, 1995)

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Configuration de l'acide lactique	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire		<i>Ac. viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	L(+)	<i>Cb. divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Ec. faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétéro-fermentaire	D(-), L(+) ou D/L	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Lc. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Oe. oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D/L ou L(+)	<i>Pc. dammosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Sc. salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Tc. halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes	Homofermentaire	L(+)	<i>Vc. fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petits bacilles	Hétérofermentaire	D/L ou D(-)	<i>We. viridescens</i>

a. Le genre *Lactobacillus*

Décrit, pour la première fois, par Beijerinck en 1901, il comprend actuellement, au moins 145 espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov *et al.*, 2011). Cette diversité est due à la variation en contenu guanine/cytosine (G/C) qui varie entre 30 et 55 % selon les espèces (De Vos *et al.*, 2009). La morphologie des cellules varie d'une espèce à l'autre de coccobacilles aux bacilles fins et allongés (Euzéby, 2000).

b. Le genre *Lactococcus*

Les cellules de ce genre sont mésophiles, se présentent sous forme de coques, isolées, en paires ou en chaînettes de longueur variable de 0,5 à 1 µm (Desmazaud, 1990). Ce sont des microorganismes homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+) (Delaglio, 1994). Leur contenu en G+C varie de 34 % à 43 % (Martin Dworkin, 2006).

c. Le genre *Enterococcus*

Les cellules de ce genre sont des coques à métabolisme aéro-anaérobie, à Gram positif, se présentant habituellement sous forme de chaînettes. Ils sont utilisés comme agents de fermentation homolactique dans les industries alimentaires, mais on les trouve également en tant qu'agent contaminant. Ce sont des pathogènes opportunistes causant des septicémies, infections urinaires, ou abdominales d'origine intestinale. Ils sont la cause de plus de 10 % des infections nosocomiales (Bouvet, 2010). De plus, les entérocoques ont l'aptitude de résister à des milieux très acides, ce qui leur permet de franchir la barrière stomacale. Les deux principales espèces de cette famille sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

4. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Douault et Corthier, 2000). On peut également les trouver dans le sol, les engrais, ou encore dans les eaux d'égout (Stiles et Holzappel, 1997). En fait, grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique (de Roissard et Luquet, 1994). Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en tant que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire. Elles sont utilisées dans l'alimentation, sont considérées comme non pathogènes et sont qualifiées d'organismes GRAS (Generally Recognized As Safe) (Adams et Marteau, 1995 ; Aguirre et Collins, 1993). Cependant, quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus*, ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Aguirre et Collins 1993).

5. Identification des espèces bactériennes

a. Par des techniques usuelles

L'identification bactérienne était initialement basée sur l'aspect macroscopique, microscopique, ainsi que sur différents tests biochimiques (Carbonnelle *et al.*, 1987). Par la suite, vers les années soixante-dix l'utilisation des galeries API s'est généralisée pour standardiser l'identification des espèces (Butler *et al.*, 1975). 20 ans plus tard, des systèmes automatisés d'identification ont vu le jour (comme le Vitek-2®, ou le BD Phoenix®) permettant une identification en 2 à 6 h d'incubation. Le principe étant de comparer le profil de la souche inconnue par rapport à ceux répertoriés dans la banque de données (Gavin *et al.*, 2002). Au début des années 90, l'identification des espèces et des sous espèces par les techniques de biologie moléculaire, notamment le séquençage génétique est apparue, permettant ainsi, de palier les erreurs pouvant avoir lieu lors de l'identification biochimiques (Clarridge, 2004 ; Petti *et al.*, 2005). En effet, la séquence nucléotidique de l'ADNr 16S présente des régions hautement conservées et communes chez toutes les bactéries, alors que d'autres régions sont spécifiques de l'espèce. Les segments amplifiés par PCR sont séquencés et analysés par comparaison avec ceux répertoriés dans les banques de données.

Il existe d'autres techniques d'identification, basée sur l'utilisation de sondes nucléiques marquées (fragment d'ADN connu) sans PCR préalable, permettant de détecter une hybridation telle que la technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Ce sont des techniques rapides et sensibles, mais très peu utilisées dans les laboratoires de routine (Almeida *et al.*, 2013 ; Forrest, 2007).

b. Par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS), est une technique physique d'analyse permettant de mesurer la masse des molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Son utilisation en microbiologie permet d'identifier les bactéries au niveau de la famille, du genre, de l'espèce, et parfois même au niveau de la sous-espèce. Le principe est basé sur la transformation préalable des molécules et des atomes en ions en phase gazeuse, avant d'être analysés par un spectromètre de masse.

La mesure de la masse par la technique MS-MALDI consiste à mélanger en excès une matrice (solution organique saturée en cristaux) avec un échantillon (colonie), le mélange étant ensuite déposé sur une plaque de métal, puis inséré dans le spectromètre de masse pour réaliser l'analyse. Le protocole commence par un séchage, ce qui aboutit à un mélange matrice-échantillon cristallisé, ce mélange est alors irradié brièvement par un faisceau laser (en général un laser à azote (N₂) de longueur d'onde 337 nm dans les instruments MALDI-TOF spécifique pour le diagnostic bactérien). Des centaines de tirs laser sont par la suite impulsés sur la cible afin de maximiser le processus d'ionisation et d'obtenir un spectre correct.

6. Utilisation

a. Dans le domaine agroalimentaire

A travers les composés de leur métabolisme, les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la production de nombreux produits fermentés en développant leurs textures, à leurs saveurs et leurs arômes, ainsi que dans la conservation de ces aliments.

Les bactéries lactiques interviennent essentiellement dans l'industrie laitière par de nombreuses transformations (Pilet *et al.*, 2005) via notamment la production d'acide lactique. Elles permettent ainsi la fermentation du lait en crème maturée, en laits fermentés comme le yaourt et les fromages frais et affinés. Elles sont également impliquées dans la vinification, la fabrication des salaisons, la boulangerie traditionnelle ainsi que dans la préparation de

nombreux produits végétaux fermentés (Desmazeaud, 1998). En plus de l'acide lactique, certaines espèces de bactéries lactiques ont par exemple la capacité de synthétiser, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture, la viscosité et d'augmenter l'homogénéité du produit fini (Desmazaud, 1983 ; Dupont, 1998). D'autres espèces synthétisent des composés à l'origine du développement aromatique tels que ceux issus du métabolisme du citrate dont l'acétoïne, le diacétyle et l'acétaldéhyde sont les plus importants (Aubert, 1998 ; Boudjemaa, 2008).

D'une manière générale, la biodégradation des aliments est causée essentiellement par différents microorganismes indésirables (bactéries, levures ou encore des moisissures) qui s'y développent et les rendent le plus souvent impropres à la consommation, tout en altérant l'aspect ou la saveur du produit par rancissement et/ou putréfaction. Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la conservation des produits alimentaires (Bousmaha *et al.*, 2006). En effet, elles sont capables de produire une variété de produits inhibiteurs dont les effets peuvent se répercuter sur la flore lactique elle-même mais aussi et surtout sur la flore indésirable ou pathogène (Piard et Desmazaud, 1991). Elles permettent ainsi l'amélioration de la qualité hygiénique et marchande en réduisant d'avantage les risques de croissance de microorganismes indésirables.

b. Dans le domaine de la santé

L'intérêt des bactéries lactiques dans le domaine de la santé humaine a été suggéré en 1907 par le Russe Metchnikoff, qui a montré que les *Lactobacillus spp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en améliorant les propriétés de sa flore. Les bactéries lactiques ont le pouvoir de synthétiser des molécules à action bactéricide et/ou bactériostatique (Brul et Coote, 1999) comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reutéline et les bactériocines (De Vuyst et Vandamme 1994).

Ainsi, le peroxyde d'hydrogène connu depuis longtemps pour son activité antimicrobienne peut s'accumuler et inhiber différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan *et al.*, 2005).

D'autre part, l'accumulation de dioxyde de carbone (CO₂) dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor *et al.*, 2006), et peut ainsi inhiber la croissance de nombreux germes d'altération essentiellement les germes psychrotrophes à Gram

négatif. De même, le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes, bactéries ou moisissures.

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol. Elle a un large spectre d'activité, allant des procaryotes (à Gram+ ou à Gram-), des eucaryotes, des virus, des champignons jusqu'aux protozoaires. Cette substance a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004).

Par ailleurs, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques. Il s'agit de celles ingérées en quantité suffisante, exercent ainsi un effet potentiellement bénéfique sur la santé de l'hôte (Dacosta, 2001). Leurs bienfaits sur la santé humaine ont été démontrés par de nombreuses études au cours des dernières années (Salminen *et al.*, 2004). Les probiotiques ont un immense potentiel d'application dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques. Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques, les probiotiques sont utilisés comme des compléments dans les produits alimentaires tels que les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. Parmi leurs bienfaits sur la santé humaine on peut citer :

- Leur pouvoir inhibiteur sur le développement et la synthèse de toxines par d'autres microorganismes pathogènes (Karovicova et Kohajdova, 2003) ;
- Leur capacité à prévenir et à traiter des diarrhées dues aux infections gastro-intestinales (Lyons, 2000). Elles peuvent également être utilisées pour la lutte contre *Clostridium* et *Helicobacter pylori* (Calvez *et al.*, 2009).
- Leurs propriétés digestives : certaines souches de probiotiques, notamment les lactobacilli excrètent la β galactosidase souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilitent ainsi la digestion du lactose. Elles semblent faciliter cette digestion en agissant également sur les activités de la lactase et de l'invertase des cellules épithéliales du tractus digestif (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997). De manière générale, elles stimuleraient l'activité enzymatique des microorganismes endogènes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments.

Les bactéries lactiques (probiotiques) sont également utilisées dans le traitement de certaines allergies alimentaires ou bien dans la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson (Reid *et al.*, 2003). Elles ont aussi, des propriétés anticancérogènes et antihypercholestérolémiques.

Une autre caractéristique importante des bactéries lactiques, est la production de bactériocines. Cette capacité leur permet d'inhiber certaines souches spécifiques pathogènes. C'est le cas notamment d'une souche de *Bifidobacterium longum* produisant un peptide antimicrobien dénommé bifilong, capable d'inhiber certaines bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Kang *et al.*, 1989). Anand *et al.*, (1984), ont pu isoler une souche de *Bifidobacterium bifidum* NCDC 1452 qui produit une bactériocine, la bifidine.

Les bactériocines sont des substances de nature protéique, synthétisées par un très grand nombre d'espèces de bactéries lactiques. Elles ont une action contre les bactéries à Gram+ associées à l'altération de la qualité hygiénique des aliments et à certaines pathologies humaines (Medina *et al.*, 2007). Leur activité antimicrobienne est généralement dirigée vers des bactéries phylogénétiquement proches (Green et Klaenhammer, 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007). Elles représentent une large gamme de peptides qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'activité et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Ces dernières décennies, les recherches scientifiques se sont intensifiées dans la recherche de nouvelles bactériocines ayant un potentiel d'application aussi bien dans le domaine alimentaire que pharmaceutique.

III. Les bactériocines

1. Définition

Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques, mais peuvent être une véritable alternative à ces derniers (Cotter *et al.*, 2013). Ce sont des peptides dont la potentialité antimicrobienne n'a cessé d'être démontrée depuis trois décennies. Ce sont des peptides de faible poids moléculaire, cationiques et hydrophobes. Ils sont synthétisés par voie ribosomique sous forme de peptides inactifs qui deviennent actifs en milieu extracellulaire (Cotter *et al.*, 2005). Ils sont sensibles aux protéases, tolérants aux contraintes thermiques élevées et présentent une activité maximale à pH acide (Ennahar *et al.*, 2000), exceptée la mutacine RM-10 qui est plus stable à pH alcalin (Fukushime *et al.*, 1982). Ces peptides sont également incolores, inodores et insipides, ce qui renforce encore plus leur potentiel d'utilité. Ils ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches phylogénétiquement de la souche productrice (Tagg *et al.*, 1976), et présentent un spectre d'activité étroit envers des espèces pathogènes (Naghmouchi *et al.*, 2007). Cependant, ils peuvent avoir également un spectre plus large incluant des espèces plus distantes de la souche productrice (Kemperman *et al.*, 2003).

La définition la plus généralement acceptée est celle proposée par Klaenhammer (1988), qui définit les bactériocines comme des protéines ou complexe de protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice. Cette activité antibactérienne varie considérablement en fonction de leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur spectre d'activité et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

Du point de vue activité antibactérienne, les bactériocines ont été désignées comme des antibiotiques (**Tableau 2**). Cependant, elles se différencient de ces derniers par leur synthèse, leur mode d'action antimicrobien, leur spectre d'activité, leur toxicité, leurs mécanismes de résistance, ainsi que, leurs applications et effets cliniques (Davis 1999 ; Chen Hoover, 2003 ; Nes *et al.*, 2011).

Tableau 2. Différence entre les bactériocines et les antibiotiques (Nes *et al.*, 2011)

Caractérisation	Bactériocines	Antibiotiques
Application	Alimentaire	Clinique
Synthèse	Voie ribosomique	Métabolites secondaires
Spectre d'activité	Étroit	Large
Activité antibactérienne	De l'ordre de quelques micro à nano-molaires	De l'ordre de quelques micro-molaires
Sensibilité aux enzymes protéolytiques	Oui	Non
Stabilité thermique	Élevée	Faible
Couleur/ gout/ Odeur	Non	Oui
Mode d'action	Formation de pores/ Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Membrane cellulaire/ cible intracellulaire
Toxicité vers les cellules eucaryotes	Non	Oui
Spectre du pH d'activité	Large	Étroit

Toutes les bactériocines produites par les bactéries lactiques décrites jusqu'à présent, ont une activité dirigée contre les bactéries à Gram⁺. Chez les bactéries à Gram⁻ la présence de la membrane externe ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne (siège de leur activité). Pourtant, certains auteurs ont observé que certaines bactériocines exerçaient un effet inhibiteur contre des bactéries à Gram négatif (Todorov *et al.*, 2005). Cette activité aurait

lieu lorsque la structure de la membrane externe est altérée (Ananou *et al.*, 2005, Shelburne *et al.*, 2007).

2. Historique

L'histoire des bactériocines a commencé en 1925 lorsque Gratia a découvert la première bactériocine nommée « colicine », isolée à partir d'*Escherichia coli* et possédant une activité bactéricide envers une autre souche d'*Escherichia coli* (Gratia, 1925) (**Figure 4**). Cette substance inhibitrice a été appelée colicine en référence à l'espèce productrice (Frederiq, 1946). Cependant, la découverte de la pénicilline à cette époque (premier antibiotique) a éclipsé cette découverte.

La découverte d'une bactériocine chez les lactocoques remonte à 1933 par Whithead, qui avait observé dans un lot de lait que la présence de deux souches de lactocoques inhibait la croissance d'un ferment d'une culture fromagère (**Figure 4**). Par la suite, l'étude démontra que les deux lactocoques produisaient une substance de nature protéique résistante au traitement thermique (Whithead, 1933).

Ce n'est qu'en 1944 que la première bactériocine d'origine lactique «la diplococcine », fut identifiée (Oxford, 1944). Hirsch *et al.*, ont démontré en 1951 que la nisine inhibait la croissance du *clostridium* lors de la maturation d'un fromage de type suisse, et c'est à partir de cette année que l'utilisation des bactériocines dans la lutte contre les contaminations alimentaires fut proposée (**Figure 4**).

Plusieurs études ont, depuis, été menées en utilisant différentes techniques de détection, de dosage et de typage (Fredericq, 1957 et 1963). Par la suite, les études ont porté sur la biologie moléculaire de ces substances, leur biosynthèse, leur mode d'action...(**Figure 4**), ce qui a permis d'identifier et de répertorier près de 200 bactériocines dans la base des données Bactibase (Hassan *et al.*, 2012). Toutes ces bactériocines ont des structures et des mécanismes d'actions différents. Ainsi, contrairement aux antibiotiques, les bactériocines peuvent cibler spécifiquement les bactéries pathogènes sans altérer celles essentielles pour notre système. De plus, certaines bactériocines possèdent une action antimicrobienne plus vaste qui peut s'étendre jusqu'aux protozoaires, levures, champignons et virus (Reddy *et al.*, 2004). Ce qui fait qu'en plus de leur utilisation comme alternative aux produits chimiques dans le secteur agro-alimentaire, elles peuvent également trouver des applications dans le secteur médical.

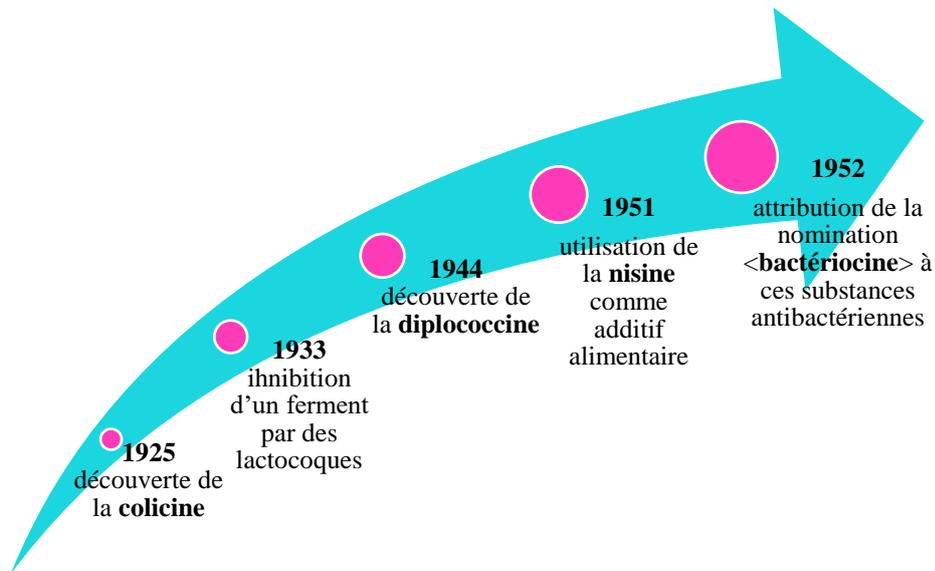


Figure 4. Histoire de la découverte des bactériocines au fil du temps

3. Nomenclature

L'utilisation du mot « bactériocine » a été proposée en 1952 par Jacob *et al.*, pour désigner toute protéine à action antibactérienne. Différentes règles de nomenclature ont déjà été proposées pour les bactériocines (Hamon, 1964), mais aucune n'a réellement été adaptée de façon unanime. De manière générale, et pour des raisons de simplification, la majorité des désignations donnée aux nouvelles bactériocines est attachée soit au genre soit à l'espèce où la bactériocine a été décrite pour la première fois (Karthikeyan et Santhosh, 2009). A titre d'exemple, la pédiocine produite pour la première fois par *Pediococcus acidilactici* (Henderson *et al.*, 1992) ou la plantaricine produite par *Lactobacillus plantarum* (Anderssen *et al.*, 1998).

4. Classification

La découverte permanente de nouvelles structures de bactériocines fait que leur classification a été revue plusieurs fois et à chaque fois remise à jour (Klaenhammer, 1993; Ennahar *et al.*, 2000; McAuliffe *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007). La majorité des bactériocines produites par les bactéries lactiques sont classées en fonction de leur structure, leur poids moléculaire et de leur spectre d'action (Makhloufi *et al.*, 2011).

a. Classification selon Klaenhammer

La première classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques fut proposée par (Klaenhammer, 1988) et remise à jour en 1993 (Klaenhammer, 1993). Cette

classification qui reste la base de toute nouvelle modification, divise les bactériocines en quatre classes :

i. Classe I

C'est la classe des lantibiotiques, elle comprend des peptides de faible poids moléculaire inférieur à 5 KDa, stables à la chaleur et contenant des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement comme la lanthionine, la β méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydrolanine. Cette classe se divise en deux sous-classes (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002) :

- Classe Ia : englobe les peptides cationiques hydrophobes allongés, leur chaîne peptidique peut contenir jusqu'à 34 acides aminés.
- Classe Ib : comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et leur chaîne peptidique contient jusqu'à 19 acides aminés.

La bactériocine la plus connue de cette sous classe est la nisine (lantibiotique de 34 acides aminés) produite à partir des souches *Lactococcus lactis subsp lactis*.

ii. Classe II

Les bactériocines de cette classe ne contiennent pas d'acides aminés modifiés. Elles ont en général une taille inférieure à 10 KDa, thermostables et chargées positivement à pH neutre (leur point isoélectrique pI varie entre 8 et 10). Cette classe est divisée en trois sous-classes, qui se caractérisent par un site de maturation conservé Gly-Gly situé sur le peptide signal.

- ✓ IIa : les bactériocines de cette sous-classe ont toutes une partie N-terminale hydrophobe avec une séquence consensus YGNGV, ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes* ;
- ✓ IIb : elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour obtenir une activité biologique. Parmi ces deux peptides on distingue le type E (Enhancing) où l'un augmente l'activité de l'autre, et le type S (Synergie) où les deux peptides doivent être présents en quantité approximativement équivalente et sont complémentaires (Nissen Meyer *et al.*, 1992);
- ✓ IIc : cette-sous classe comprend les bactériocines n'appartenant à aucune des sous-classes citées (Hastings *et al.*, 1991 ; Holck *et al.*, 1992 ; TichacZek *et al.*, 1992 ; Chikinds *et al.*, 1995).

Parmi les bactériocines de cette classe on trouve la pédiocine PA-1et la sakacine P, (Hastings *et al.*, 1991 ; Holck *et al.*, 1992 ; Tichaczek *et al.*, 1992 ; Chikinds *et al.*, 1995), la lactacine F (Allison *et al.*, 1994), la lactococcine G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), ou la brochocine C (McCormick, *et al.*, 1998).

iii. Classe III

C'est la classe des bactériocines à haut poids moléculaire (supérieure à 30 KDa) et thermosensibles. On trouve dans cette classe à titre d'exemple : l'helvéticine I, lacticines A et B (Joerger et Klaenhammer, 1986 ; Toba *et al.*, 1991).

iv. Classe IV

Cette classe englobe les bactériocines complexes, autrement dit, les bactériocines ayant besoin d'une partie non protéique pour avoir de l'activité biologique. Cette partie peut être de nature carbohydratée ou lipidique (Klaenhammer, 1993).

b. Classification selon Cotter *et al.*, (2005)

Une autre classification a été proposée par Cotter *et al.*, (2005), en éliminant certaines classes et en restaurant d'autres dans d'autres classes. Cette classification repose essentiellement sur la résistance à la chaleur, sur la taille et sur les propriétés physico-chimiques des peptides antibactériens (Nes *et al.*, 1996 ; Cotter *et al.*, 2005 ; Diop *et al.*, 2008) (**Figure 5**).

c. Classification selon Heng et Tagg (2006)

Heng et Tagg (2006) ont de leur part proposé une nouvelle classification des bactériocines. Celle-ci est considérée comme universelle car elle prend en compte les bactériocines produites aussi bien par les bactéries à Gram+ que les bactéries à Gram-. Cette classification divise les bactériocines en quatre classes avec des sous-groupes (**Figure 5**).

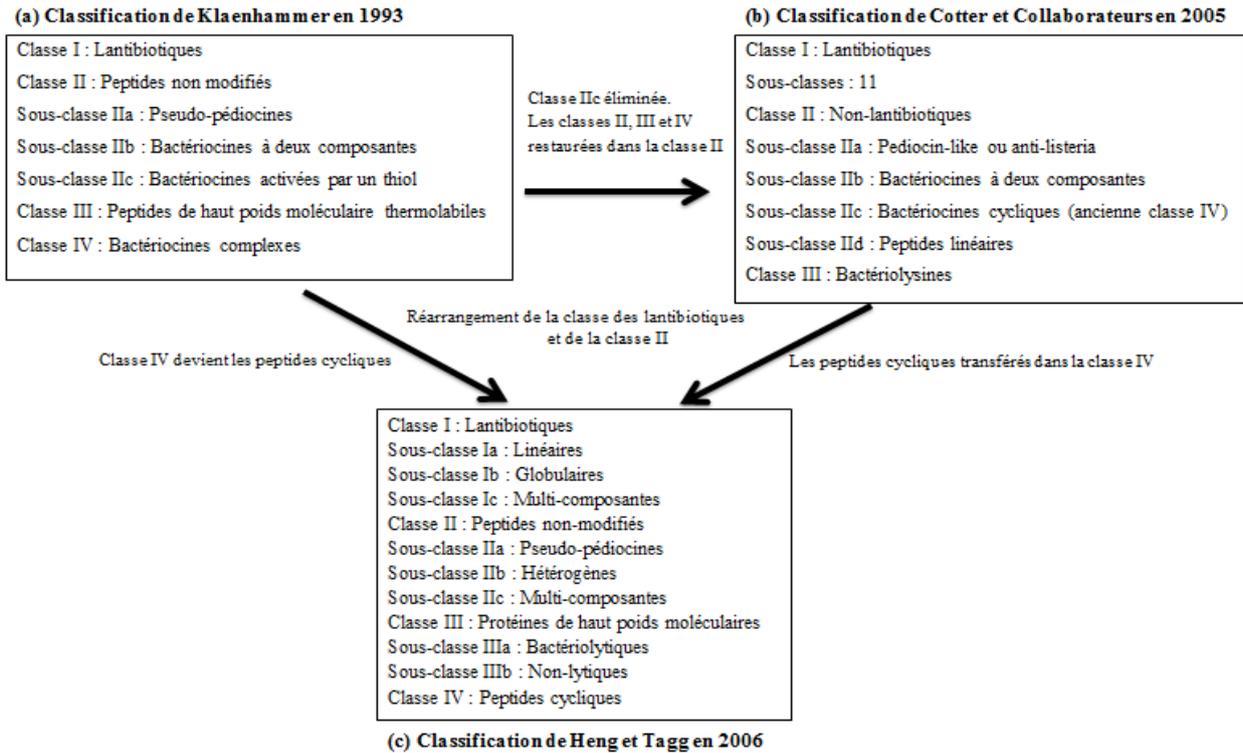


Figure 5. Classification universelle des bactériocines reprise avec quelques modifications. (a) Classification proposée par Klaenhammer (1993), (b) Classification proposée par Cotter *et al.*, (2005) et (c) Classification proposée par Heng et Tagg (2006)

Récemment, Zouhir *et al.*, (2010) ont proposé de classer les bactériocines en douze classes en utilisant comme seul repère leurs structures primaires (**Tableau 3**).

Tableau 3. Classification des bactériocines proposée par Zouhir *et al.*, 2010

Les bactériocines produites par les bactéries Gram +	Classe I	Ia : les lantibiotiques
		Ib : Les labyrinthopeptides
		Ic : Les sactibiotiques
	Classe II	IIa : Les bactériocines ressemblant à la pédiocine
IIb : Les bactériocines à 2 composantes		
IIc : Cationiques, hydrophobes, thermorésistantes		
IId : Peptides linéaires non modifiés ne ressemblant pas à la pédiocine		
	Les bactériolysines	
Les bactériocines produites par les bactéries Gram-	Colicines	
	Microcines	
Les archéocines		

d. Classification selon Alvarez-Sieiro *et al.*, (2016)

Très récemment, Alvarez-Sieiro *et al.*, (2016) ont proposé une nouvelle classification ciblant principalement les bactériocines des bactéries lactiques. Cette classification consiste en une légère modification qui se traduit par l'apparition de nouvelles sous-classes, basées essentiellement sur le mécanisme de biosynthèse et l'activité biologique des bactériocines. Ceci, est en accord avec les propositions précédentes (Cotter *et al.*, 2013, Arnison 2013). Cette classification répartit les bactériocines en trois classes :

i. Classe I

Classe des petits peptides modifiés post-traductionnellement (à poids moléculaire inférieur à 10 kDa). Cette classe englobe tous les peptides ayant subi une modification enzymatique au cours de la biosynthèse, et fournit donc des molécules avec des acides aminés modifiés (Arnison *et al.*, 2013 ; Medema *et al.*, 2015).

- ✓ **Sous-classe Ia** (Lanthipeptides types I, II, III et IV) : Les lanthipeptides sont des peptides possédant des acides aminés inhabituels, comme la lanthionine (Arnison *et al.*, 2013).
- ✓ **Sous-classe Ib** : Peptides cyclisés de tête-à-queue : Les bactériocines cyclisées de tête-à-queue sont un groupe de RIPP (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides) dont les deux extrémités N et C-terminales sont liées par une liaison peptidique, ce qui rend la molécule circulaire (**Figure 6**).
- ✓ **Sous-classe Ic** (Sactibiotiques) : Les bactériocines de cette classe ont été identifiées *in silico*. Elles possèdent toutes une molécule de soufre liée au carbone alpha du peptide. Cependant, il n'y a pas eu de sactipeptide produit par des bactéries lactiques caractérisé jusqu'à présent (Murphy *et al.*, 2011). Le sactipeptide le mieux étudié, est la subtilosine A ; peptide circulaire à charge négative produit par *Bacillus subtilis* (**Figure 6**) (Kawulka *et al.*, 2003; Maqueda *et al.*, 2008) ; il présente une activité à large spectre vis-à-vis de diverses bactéries (Montalbán-López *et al.*, 2011, Mathur *et al.*, 2015).
- ✓ **Sous-classe Id (peptides linéaires avec (Azol) LAPs)** : C'est la sous-classe des peptides contenant de l'azole linéaire (LAP). Ce sont des peptides possédant diverses combinaisons d'anneaux hétérocycliques de thiazole et méthylxazole (Melby *et al.*, 2011).
- ✓ **Sous-classe Ie** (glycocines) : Les glycocines sont des bactériocines contenant des résidus glycosylés (Arnison *et al.*, 2013). En effet, la Glycocin F produite par *Lactobacillus plantarum* était la première glycocine décrite des bactéries lactiques (Stepper *et al.*, 2011).

- ✓ **Sous-classe If (les peptides lasso) :** Les peptides lasso sont un groupe de RiPPs qui se caractérisent principalement, par la présence d'un lien amide entre le premier acide aminé de la chaîne peptidique de base et les résidus chargés négativement dans les positions +7 à +9, générant ainsi une bague qui englobe la partie linéaire C-terminale du polypeptide (**Figure 6**) (Arnison *et al.*, 2013 ; Hegemann *et al.*, 2015). Les peptides lasso, en plus de leur activité anti-antimicrobienne, auraient des effets antiviraux ou anticancéreux (Maksimov *et al.*, 2012).

ii. Classe II

C'est la classe des bactériocines non modifiées (à poids moléculaire inférieur à 10 kDa). Elles ne contiennent pas de modifications inhabituelles, et ne nécessitent donc pas d'enzymes pour leur maturation.

- ✓ **Sous-classe IIa (bactériocines de type pédiocine) :** Les bactériocines de la sous-classe IIa de type pédiocine ont un large spectre d'activité et spécialement contre *Listeria monocytogenes* (Kjos *et al.*, 2011). La structure des peptides de cette sous-classe peut être divisée en deux régions distinctes séparées par une charnière flexible (Haugen *et al.*, 2008). La première moitié, située au niveau à l'extrémité N-terminale contient un motif YGNGVXC conservé, qui est impliqué dans l'interaction avec la cible (Cui *et al.*, 2012). La deuxième moitié se situe à l'extrémité C-terminale (moins conservée) et semble être impliquée dans la spécificité de la cellule cible (Cui *et al.*, 2012).
- ✓ **Sous-classe IIb (bactériocines à deux peptides) :** Les bactériocines de la sous-classe IIb sont constituées de deux peptides très différents, dont l'activité nécessite la présence des deux peptides en quantités à peu près égales (Nissen-Meyer *et al.*, 2010). C'est le cas notamment de la lactococcine G produite par *Lactococcus lactis* (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). Cependant, pour d'autres telles que la thermophiline 13 produite par *Streptococcus thermophilus* (Marcis *et al.*, 1997), les peptides ont des propriétés antimicrobiennes séparément, leur combinaison permet toutefois d'amplifier l'activité.
- ✓ **Sous-classe IIc (bactériocines sans peptide leader) :** Ces bactériocines sont uniques car elles sont synthétisées sans peptide leader N-terminal, qui fonctionne habituellement comme une séquence de reconnaissance pour la sécrétion, la modification et pour le maintien de la bactériocine inactive à l'intérieur de la cellule productrice (Liu *et al.*, 2011; Masuda *et al.*, 2012).

- ✓ **Sous-classe II d (non-pediocin-like, un seul peptide) :** Il s'agit d'un groupe hétérogène qui ne fait pas partie des bactériocines de nature peptidique linéaire. Elle se caractérise par des structures, des mécanismes de sécrétion, et des modes d'action différents, telles que la lactococcine 972, la lactococcine A et l'entéroccine B (Franz *et al.*, 2007).

iii. Classe III

Il s'agit de bactériocines non modifiées de taille supérieure à 10 kDa avec un mécanisme d'action bactériolytique ou non lytique. C'est la classe des bactériocines thermolabiles et à grande masse moléculaire. Elle se caractérise généralement par des composés de différents domaines. C'est le cas, à titre d'exemple, de l'entérolysine A qui contient un domaine endopeptidase N-terminal et un domaine de reconnaissance de substrat C-terminal similaire à la zoocine A (Lai *et al.*, 2002 ; Nilsen *et al.*, 2003). Aucune bactériocine non lytique de cette classe n'est encore caractérisée.

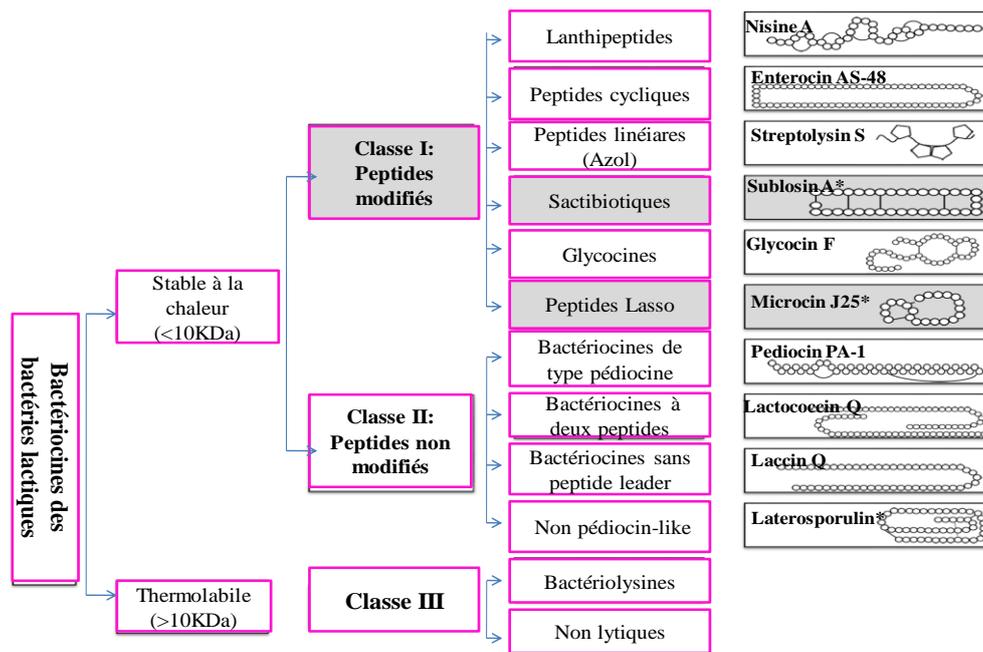


Figure 6. Classification proposée pour les bactériocines des bactéries lactiques et leur structures (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Les cases grises ont été identifiées *in silico*. (*bactériocines des bactéries non lactiques)

Au vu des différentes classifications proposées, nous adoptons pour la suite du rapport la classification la plus récentes, celle de Alvarez-Sieiro *et al.*, (2016), car elle englobe les bactériocines des bactéries lactiques.

5. Biosynthèse et régulation

La biosynthèse des bactériocines nécessite l'interaction de plusieurs facteurs, à savoir, l'action d'une multitude de gènes codants pour des protéines d'induction, de structure, de modification, de transport, de clivage et de maturation. En effet, les bactériocines sont produites sous forme d'un pré-peptide non actif biologiquement qui subira par la suite des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif.

De façon générale, la production de la bactériocine est souvent régulée par un système de *Quorum Sensing* qui permet à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

a. Biosynthèse des petits peptides modifiés post-traductionnellement (Classe I)

Les gènes responsables de la biosynthèse des lantibiotiques sont désignés par le symbole **Lan** (référence aux lantibiotiques). **Lan A** est le gène de structure qui code pour un pré-peptide de 23 à 30 acides aminés avec une séquence N_t (N-terminale). Ce pré-peptide subira des modifications post-traductionnelles pour acquérir les quatre acides aminés inhabituels (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Kleerebezen, 2004 ; Xie *et al.*, 2004 ; Patton *et al.*, 2005).

La régulation de la biosynthèse des lantibiotiques est sous le contrôle d'un mécanisme à deux composants, basé sur le *Quorum Sensing*. Le processus de production commence par un stimulus extérieur qui est la bactériocine elle-même. Présente dans la culture à basse concentration au début de la croissance, elle induit la phosphorylation d'un régulateur de réponse **Lan R** via une histidine kinase **Lan K**. Ce régulateur phosphorylé permet par la suite l'activation de la transcription des gènes de structure, de transport et aussi d'immunité (**Figure 7**). Il s'agit donc d'une autorégulation (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002 ; Kleerebezem, 2004 ; Patton *et al.*, 2005).

La cellule bactérienne se protège de la bactériocine qu'elle produit par ses gènes d'immunité. En effet, Lan I, Lan F, Lan E et Lan G sont les quatre gènes qui codent pour des protéines impliquées dans l'immunité de la souche vis-à-vis de sa bactériocine. Bien que le mécanisme d'action ne soit pas complètement étudié, il semblerait que le Lan I code pour une lipoprotéine qui s'attache à la surface de la membrane externe (siège d'activité de la bactériocine) et interagit avec le lantibiotique, l'empêchant ainsi d'y former des pores, et par conséquent de franchir la membrane de sa cellule productrice. Par ailleurs, les Lan F, E et G codent pour un ATP Binding Casquette (ABC) transporteur qui exporte la bactériocine vers

l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002 ; Stein *et al.*, 2003 ; Lubelski *et al.*, 2008).

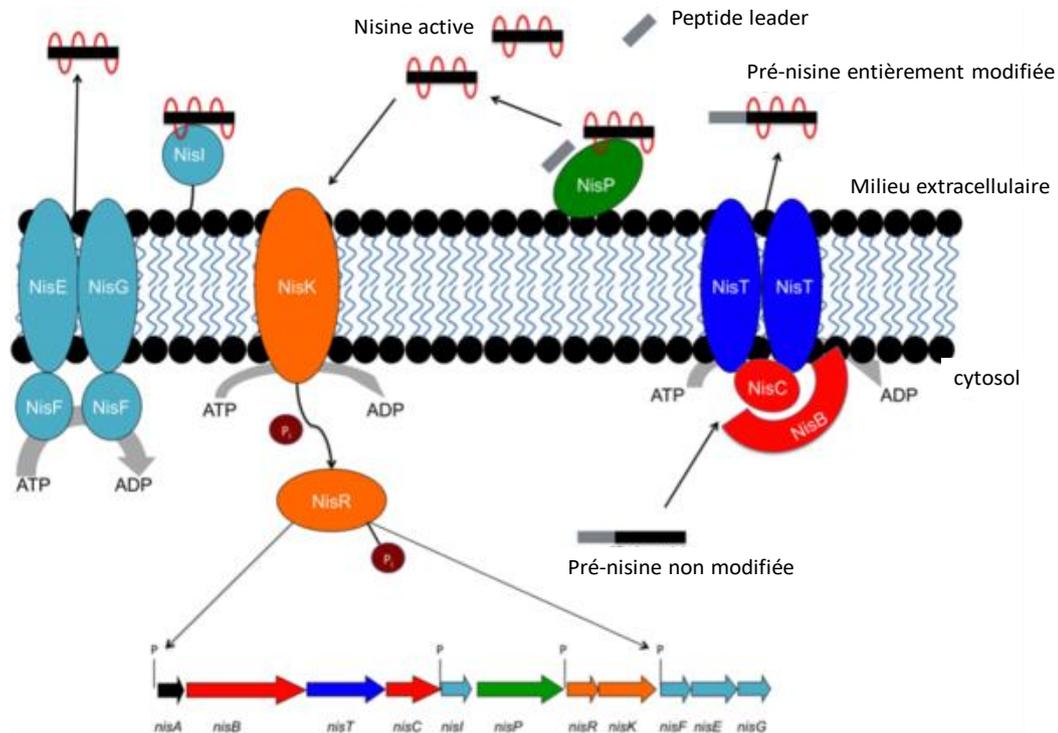


Figure 7. Biosynthèse de la nisine et auto-immunité. Les gènes et les protéines impliqués dans des événements similaires sont mis en évidence avec des couleurs identiques. Les gènes et les protéines de modification sont représentés en rouge, le transport en bleu, le traitement en vert, la régulation de la biosynthèse en orange et l'auto-immunité (cyan). Le pré-peptide de nisine est montré en (gris/noir) alors que la nisine active est noire avec des anneaux de (méthyl)lanthionine indiqués en rouge (Abts *et al.*, 2013).

✚ Cas de la nisine (classe Ia)

La maturation de la nisine est un processus englobant plusieurs réactions enzymatiques. Le précurseur est modifié par la déshydratase NisB qui déshydrate la sérine et la thréonine via glutamyl-glutamylation dépendant de l'ARNt (Garg *et al.*, 2013 ; Ortega *et al.*, 2015). Ensuite, la cyclase NisC favorise l'attaque nucléophile réversible de type Michael du groupe thiol d'une cystéine situé du côté N-terminal (Lubelski *et al.*, 2008). Enfin, le précurseur entièrement modifié est transporté par NisT et activé par protéolyse NisP (Lubelski *et al.*, 2008). Finalement, l'enzyme bifonctionnelle LtnT supprime le peptide leader et transloque le peptide modifié (Suda *et al.*, 2012) (**figure 7 et 8**).

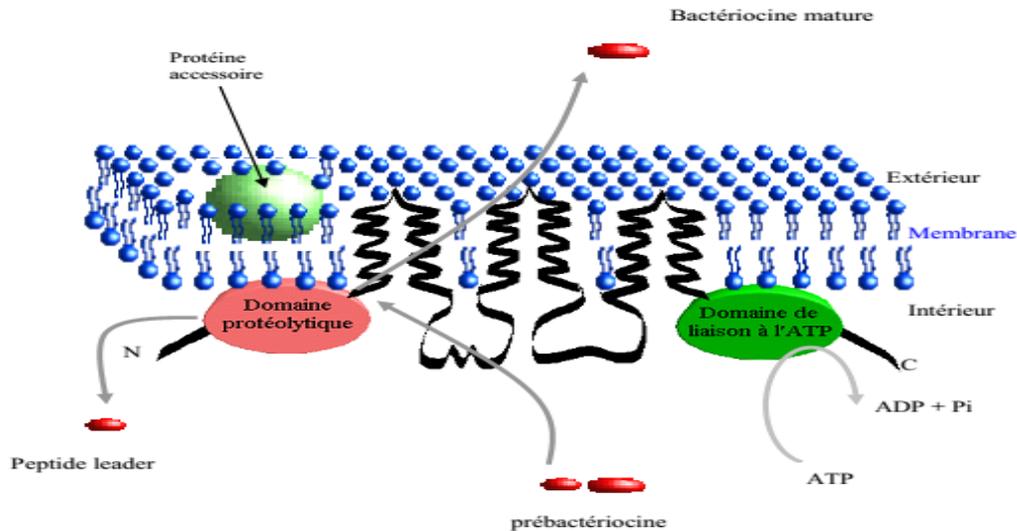


Figure 9. Mécanisme de transport et de maturation des pré-bactériocines de la sous-classe IIa possédant un peptide leader (Simon, 2001)

La régulation de la production des bactériocines de la classe IIa est sous le contrôle d'un système de *Quorum Sensing* à trois composantes : peptides d'induction, une histidine kinase et un régulateur de réponse. Le processus est sous forme d'une chaîne fermée. Autrement dit, il y a une sorte d'auto-induction (synthèse et régulation). Le peptide d'induction est produit à faible concentration dans le milieu avec ou sans activité inhibitrice. Il se caractérise par sa stabilité vis-à-vis de la chaleur, par son faible poids moléculaire, il est cationique et hydrophobe, et sa partie N-terminale est clivée au niveau du motif GG lors de l'excrétion par l'ABC transporteur (Ennahar *et al.*, 2000 ; Eijsink *et al.*, 2002). Quand le peptide d'induction atteint une certaine concentration, il active l'histidine kinase transmembranaire, ce qui induit par la suite la phosphorylation du régulateur de réponse et l'activation de l'expression des gènes de structure, d'immunité et de transport, ainsi que ceux du système de régulation à trois composantes, d'où son appellation "système auto-induit" (Eijsink *et al.*, 2002 ; Drider *et al.*, 2006).

En effet, la production des bactériocines de cette classe est codée par des gènes organisés en trois opérons, dont le premier contient des gènes de structure et d'immunité. Ce dernier, code pour une protéine intracellulaire qui interagit avec la bactériocine et la mannose perméase afin d'empêcher la bactériocine de former des pores dans la membrane de sa cellule productrice. Le deuxième opéron comprend des gènes sécréteurs de la bactériocine à l'extérieur de la cellule (ABC transporteur et une protéine accessoire). Enfin, le troisième contient des gènes du système de régulation à trois composantes (Diep *et al.*, 2007)

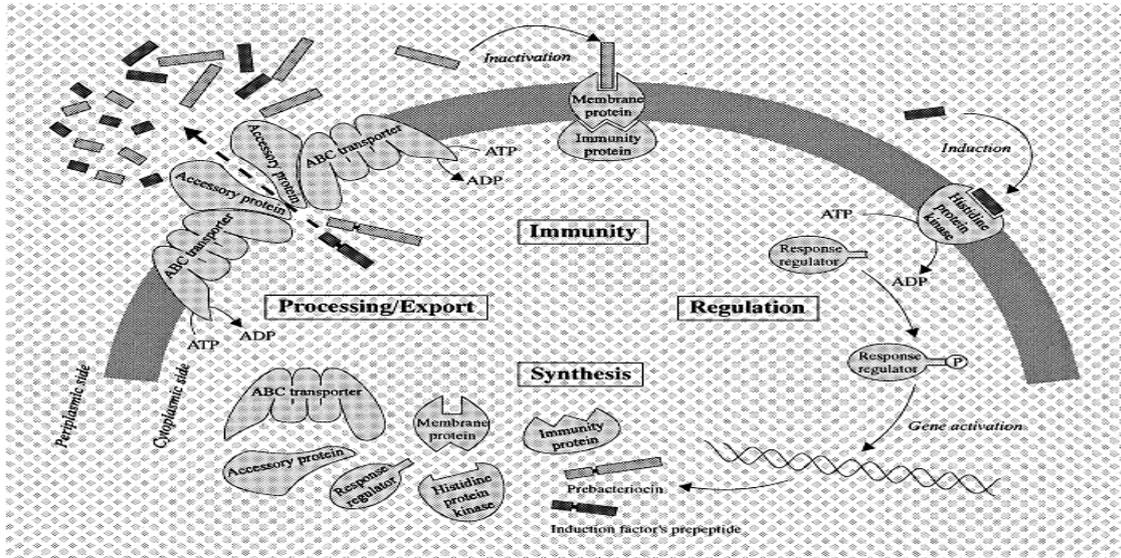


Figure 10. Aperçu schématique du mécanisme proposé pour la production de bactériocines de la classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000)

➤ Cas de la pédiocine PA-1 (classe IIa)

L'opéron de la pédiocine PA-1 contient quatre gènes, à savoir, le gène de structure *pedA* et les déterminants d'immunité *pedB*, *pedC* et *pedD* qui encodent pour une protéine accessoire transporteur ABC (Nissen-Meyer *et al.*, 2009 ; Cui *et al.*, 2012). Le peptide leader sert comme signal de reconnaissance pour le traitement et la sécrétion de la bactériocine par un transporteur ABC dédié. Les bactériocines de classe IIa peuvent être produites de manière constitutive (comme la pédiocine PA-1) ou régulée par un système QS (comme la sakacine A) (Ennahar *et al.*, 2000).

➤ Cas des entérocinines L50A et B (classe IIb)

Les gènes de structure et d'immunité des deux entérocinines L50 A et B sont situés sur le même opéron, de l'ADN plasmidique. Ainsi, ces deux bactériocines sont sécrétées sans peptides leaders sous forme de précurseurs inactifs quand ils sont encore dans le cytoplasme, ceci protège probablement la cellule contre la toxine qu'elle produit. Cependant, le mécanisme de transport de ces bactériocines vers l'extérieur reste inconnu (Jack *et al.*, 1995 ; Nes *et al.*, 1996).

c. Biosynthèse des bactériocines de la classe III

La biosynthèse des bactériocines de la classe III dépend de l'expression de trois gènes ; un gène codant pour le précurseur de la bactériocine, un gène codant pour une protéine d'immunité, et un gène codant pour une protéine de transport (Beukes *et al.*, 2000).

6. Mode d'action

Le siège de l'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle la majorité des bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries à Gram négatif, du fait qu'elles n'arrivent pas à franchir la membrane externe sauf dans de rares cas. Cependant, même si le siège d'activité est le même, les mécanismes d'action diffèrent selon les classes des bactériocines.

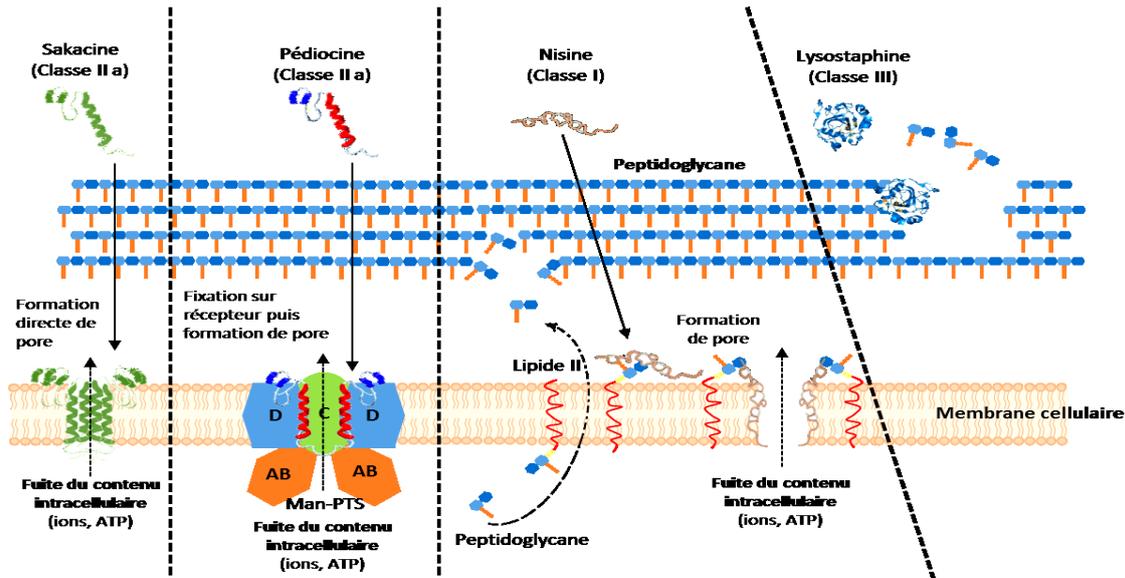


Figure 11. Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram+ (Fernandez, 2014)

a. Classe I

Les peptides appartenant à cette classe, attaquent la membrane de la cellule cible par interaction électrostatique ou bien par liaison à des récepteurs, notamment le lipide II transmembranaire impliqué dans la synthèse des peptidoglycans (**Figure 11**). Suite à cette liaison, de larges pores non spécifiques se forment dans la membrane cytoplasmique ce qui cause un efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP... et provoque ainsi, la dissipation totale du potentiel transmembranaire et du gradient de pH (Nicholls & Ferguson, 1992; Montville & Chen, 1998; Ennahar *et al.*, 2000). La force proton motrice (FPM) joue en effet, un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne (Nicholls & Ferguson, 1992). Cette cessation rapide des activités cellulaires entraîne rapidement la mort de la cellule (Ecker *et al.*, 1992).

La liaison lantibiotique-lipide II, peut conduire en même temps à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002 ; Bauer *et al.*, 2005) et même à l'inhibition de la sporulation. Par ailleurs, les lantibiotiques à deux peptides agissent également par la formation de pores dans la membrane des cellules cibles, comme la lacticine 3147, dont le peptide A1 a une activité plus élevée en présence du deuxième peptide (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

Contrairement aux autres bactériocines, la lactococcine 972 fait l'exception à la règle générale. En effet, cette bactériocine est composée de 53% d'acides aminés polaires (Martinez *et al.*, 1999). Cette caractéristique fait que la membrane extérieure de la cellule cible n'est pas son site d'action. Martinez *et al.*, (1999) ont démontré que cette bactériocine agissait sur la synthèse du septum lors de la division cellulaire. Cependant, cette inhibition n'agit pas directement sur la mort cellulaire ; la cellule est toujours en mesure de croître et de synthétiser des macromolécules. L'action bactéricide est plutôt observée lors de la division cellulaire suivante. A ce moment, la cellule commence à s'agrandir et à perdre l'intégrité de sa membrane. Ce mode d'action est cohérent avec le fait que la lacticine 972 n'affecte que les cellules en phase exponentielle. Lors de la phase stationnaire trop peu de cellules se divisent pour que ce phénomène soit observable.

b. Classe II

Le mécanisme d'action supposé pour les bactériocines de la sous-classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou avec un récepteur spécifique ; l'unité D de la mannose phospho-transférase (enzyme transmembranaire multimérique). Cette liaison induit la formation de pores dans la membrane entraînant sa perméabilisation, puis la dissipation des composantes de la force motrice provoquant ainsi la mort cellulaire (**Figure 11**) (Dalet *et al.*, 2000 ; Héchard *et al.*, 2001 ; Gravesen *et al.*, 2002 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004 ; Bauer *et al.*, 2005). Pour la sakacine, le mode d'action consiste à former des pores au niveau de la membrane interne, ce qui conduit par la suite à la mort de la cellule cible (**Figure 11**) (Fernandez, 2014).

- **Cas des bactériocines de la classe IIa** (Ex. pédiocine) : Les bactériocines de classe IIa sont constituées de trois parties aux propriétés physico-chimiques différentes. Une première se trouve dans la partie N-terminale hydrophile chargée positivement (feuillet β), se lie de façon non spécifique par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques (Abee *et al.*, 1995). Une deuxième partie C-terminale hydrophobe, s'insère dans la membrane cytoplasmique par des interactions hydrophobes et forment ainsi des pores responsables de l'augmentation

de la perméabilité membranaire. Finalement, une troisième partie qui se situe entre les deux extrémités Nt et Ct, cette partie est hydrophile, adopte une structure hélicoïdale et s'insère à l'interface hydrophile-hydrophobe des phospholipides membranaires, provoquant ainsi, la déstabilisation de la bicouche lipidique (Bennick *et al.*, 1998). Il est à noter, que la présence de coude β permet au motif YGNGV de reconnaître la cible membranaire et ainsi de s'orienter sur la surface de la membrane.

- **Cas des bactériocines de la classe IIb.** Les bactériocines de la sous-classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries à Gram positif. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules (des cations monovalents ou des anions), ce qui dissipe une ou deux composantes de la force proton motrice (Oppergard *et al.*, 2007).

Exemple des entérocinés L50 A et B : Le mode d'action des entérocinés L50 n'est pas bien étudié. Cependant, il semble que leur action soit similaire à celle des peptides antimicrobiens et/ou hémolytiques comme le cas des toxines sécrétées par les staphylocoques. Leur activité consiste à rompre les cellules en formant des pores sélectifs pour les cations dans leur membrane plasmique (Fitton *et al.*, 1980 ; Lee *et al.*, 1984).

c. Classe III

Chez les bactériocines non lytiques, l'activité bactéricide a lieu en absence de lyse cellulaire concomitante (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Cette activité se manifeste par l'hydrolyse des liaisons peptidiques des peptidoglycanes des cellules cibles. Ainsi, la lysostaphine (classe III) agit directement au niveau du peptidoglycane (**Figure 11**). La zoocine A est un autre exemple de bactériocines de la classe III qui se caractérise par un spectre d'action étroit alors que l'entérolysine A et la milléricine B ont un spectre d'action large (Nilsen *et al.*, 2003).

7. Facteurs influençant la production de bactériocines

Différentes études ont montré que plusieurs facteurs pouvaient influencer la production des bactériocines. C'est le cas notamment, de la durée et de la température d'incubation, du pH initial de culture, de la composition du milieu de culture, ainsi que de la technologie de fermentation utilisée. D'autres études ont également montré que la présence d'autres microorganismes compétitifs dans le milieu outre la souche productrice, stimulait la production des bactériocines (Tabasco *et al.*, 2009).

a. Température d'incubation et pH initial de culture

Généralement, les conditions optimales de la production des bactériocines sont inférieures à celles de la croissance de la souche productrice, notamment, la température et le pH initial du milieu de culture (Parente *et al.*, 1999 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma *et al.*, 2010). Verluyten *et al.*, (2004) ont même suggéré que lorsque les conditions de croissance bactérienne devenaient défavorables, la production des bactériocines était stimulée.

b. Composition de milieu de culture

Vu leurs exigences nutritionnelles, des milieux de culture complexes sont généralement utilisés pour la croissance des bactéries lactiques tels que le MRS, le BHI et le M17 (Elmoualdi *et al.*, 2008 ; Xie *et al.*, 2011 ; Ammor *et al.*, 2006 ; Hadji-Sfaxi *et al.*, 2011). De ce fait, la composition du milieu de culture, en particulier sa teneur en sources de carbone et d'azote influence considérablement la production de bactériocines en terme de rendement (Dortu et Thonart, 2009). Par ailleurs, certaines études ont montré que la production des bactériocines pouvait être optimisée suite à l'ajout d'extrait de levure (Benkerroum *et al.*, 2000 ; Labioui *et al.*, 2005 ; Sarika *et al.*, 2010).

c. Durée d'incubation

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. De ce fait, l'incubation doit être stoppée afin d'empêcher la dégradation des bactériocines sous l'effet des protéases produites par la bactérie (Savijoki *et al.*, 2006) et éviter la baisse de leur concentration dans la culture.

d. Présence de microorganismes compétitifs

La présence des microorganismes compétitifs dans le milieu stimule la production des bactériocines. En effet, certaines études ont montré que la production de la bactériocine lactacine B avait augmenté en présence de cellules cibles vivantes (Tabasco *et al.*, 2009). De même, Ruiz-Barba *et al.*, (2010) ont montré qu'une co-culture de la souche *Lactobacillus plantarum* NC8 avec l'espèce *Enterococcus faecium* stimulait la production de sa bactériocine.

8. Application

Les bactériocines possèdent une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Elles ont également un spectre antibactérien étroit et ont le pouvoir de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables.

Elles sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya *et al.*, 2006).

a. Alimentaire

Les bactériocines ont un énorme potentiel dans la bio-conservation alimentaire, soit seules soit en combinaison avec d'autres méthodes de conservation (Chen *et al.*, 2003). Ainsi, plusieurs études ont montré que les bactériocines de la classe IIa avaient une forte activité antimicrobienne contre des bactéries hautement pathogènes d'origine alimentaire, notamment *Listeria monocytogenes*. En 1996, Ennahar *et al.*, (1996a) ont montré que la pédiocine PA-1 produite par la souche *Lactobacillus plantarum* WHE 92 avait une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* présente dans le fromage Munster. Le développement de cette même souche de *Listeria monocytogenes* a pu être inhibé en utilisant l'enterocine 81 produite par *Enterococcus faecium* WHE 81 (1998b). Par la suite, Izquierdo *et al.*, (2009), ont utilisé la même bactériocine, enterocine 81 produite par *Enterococcus faecium* WHE81 comme culture de surface au début de la maturation du Munster et ont pu ainsi empêcher le développement de *Listeria monoocytogenes*. En 2012, une autre étude menée par Kingcha *et al.*, 2012 a montré que l'utilisation de la pédiocine PA-1 produite par *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 permettait de contrôler efficacement la croissance de *Listeria monocytogenes* dans une variété de saucisse de porc thaïlandais fermenté traditionnellement (Nham).

Plus récemment, Hammi *et al.*, (2016) ont obtenu une stabilisation de la croissance de la souche *Listeria monocytogenes* 3b LC 40 dans du lait fermenté en présence de deux bactéries lactiques productrices de bactériocines, à savoir : la souche *Lactobacillus plantarum* B productrice de la pédiocine et la souche *Lactobacillus paracasei* GRU3 multiproductrice de bactériocines (pédiocine PA-1, entérocin AS-48, entérocin B et la BacSJ2-8).

Par ailleurs, certaines études ont montré que l'incorporation de bactériocines, dans des films alimentaires permettait de réduire la croissance des microorganismes pathogènes pouvant se développer à la surface du produit durant sa conservation (Galvez *et al.*, 2007). Woraprayote *et al.*, (2013), en incorporant de la pédiocine PA-1 dans un film d'emballage ont pu réduire significativement la charge initiale de *Listeria monocytogenes* à la surface de la viande. Un autre mode d'application consiste en des gels ou des films tels que l'alginate de calcium, la cellulose, la gélatine, des films de polysaccharides...etc. Ainsi, la bactériocine sera libérée dans le produit au cours de sa conservation (Luchansky *et al.*, 2004 ; Deegan *et al.*, 2006 ; Ghalfi *et al.*, 2006).

b. Médicale

L'utilisation des bactériocines n'est pas limitée au domaine alimentaire, mais elles peuvent avoir aussi des applications en médecine humaine et vétérinaire. Leur activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo*, la variété de leurs spectres d'activité, leur faible toxicité, font que les peptides antimicrobiens peuvent constituer une alternative prometteuse aux antibiotiques (Cotter *et al.*, 2013).

Ainsi, des tests réalisés *in vivo* chez des chiens, ont montré l'inhibition par la nisine de biofilms de *Staphylococcus* ou de *Streptococcus* responsables de l'apparition de gingivites (Howell *et al.*, 1993). La nisine s'est avérée également efficace contre d'autres types d'infections, tels que les infections intra-mammaires et la mastite dues principalement, aux *Streptococcus* et *Staphylococcus* (Taylor *et al.*, 1949 ; Broadbent *et al.*, 1989 ; Cotter *et al.*, 2005a). D'autres études ont montré, que la nisine pouvait être utilisée efficacement contre *Helicobacter pylori*, responsable des infections gastro-intestinales tels que les ulcères gastriques (Guder *et al.*, 2000 ; Stern *et al.*, 2006). L'avantage de la nisine réside dans sa résistance à la pepsine et aux conditions acide de l'estomac, ce qui permet le maintien de sa stabilité et de son activité antimicrobienne (Guder *et al.*, 2000).

D'une manière générale, différentes bactériocines ont montré leur efficacité vis-à-vis de diverses infections causées par des bactéries pathogènes. Ainsi, les salivaricines A2 et B produites par des souches de *Streptococcus salivarius* ont montré une activité contre les bactéries responsables de la mauvaise haleine (Tagg, 2004). Par ailleurs, la ST4SA, une bactériocine de classe IIa, produite par *Enterococcus mundtii* s'est avérée très active contre des bactéries à Gram positif responsables d'infections au niveau de l'oreille moyenne (Knoetze *et al.*, 2008). Une autre bactériocine de la classe IIa, la divercine V41, a quant à elle montré, *in vivo* chez la souris, une activité antimicrobienne dirigée contre *Listeria monocytogenes* suggérant une utilisation potentielle de cette bactériocine pour prévenir la listériose (Rihakova *et al.*, 2010). Des études similaires ont montré que la subtilosine A, un lantibiotique produit par *Bacillus subtilis* (Babasaki *et al.*, 1985) était actif contre *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* et *Micrococcus luteus* (Sutyak *et al.*, 2008a). La subtilosine A a montré également, un effet spermicide lors de tests *in vitro* sur des spermatozoïdes humains (Sutyak *et al.*, 2008b).

9. Etat des lieux et contraintes d'utilisation

a. Etat des lieux

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi purifiée, sous forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat (produit alimentaire). Un exemple d'application sous forme de concentré de fermentation est celui de la pédiocine qui est commercialisée sous le nom de ALTA 2341 (Deegan *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007). De même, la nisine, seule bactériocine autorisée à ce jour comme additif alimentaire, est commercialisée sous le code E234 (Guinane *et al.*, 2005). Néanmoins, le cout élevé de la purification des bactériocines constitue un facteur limitant pour leur utilisation sous forme pure. Raison pour laquelle l'utilisation des bactériocines peut se faire également *in situ*, par l'incorporation directe des souches productrices dans les produits alimentaires (Leroy *et al.*, 2004).

b. Contraintes et alternatives d'utilisation

L'application des bactériocines dans le domaine alimentaire ou bien médical constitue certes une alternative naturelle aux produits de synthèse connus (Muriana *et al.*, 1996). Cependant, de nombreux facteurs peuvent limiter leur utilisation.

Ainsi, pour une application alimentaire, la composition de l'aliment (l'activité de l'eau A_w , la présence de protéines et matière grasse ...), la nature des traitements appliqués et la nature et l'importance de la flore autochtone peuvent réduire, voire inhiber totalement l'activité de la bactériocine. Muriana *et al.*, (1996) ont montré que les interactions qui pouvaient avoir lieu entre la bactériocine et les composants de l'aliment (gras, additifs...) diminuaient la solubilité et l'activité de celle-ci (Schöbitz *et al.*, 2003 ; Galvez *et al.*, 2007). Dans l'objectif de pallier ces éventuelles difficultés et d'augmenter l'activité antimicrobienne, la combinaison des bactériocines avec d'autres bactériocines ou bien avec d'autres agents antibactériens a été proposée. A titre d'exemple, la combinaison de différentes bactériocines entre elles a permis d'élargir le spectre d'action, tout particulièrement en combinant des bactériocines appartenant à des classes différentes (Vignolo *et al.*, 2000). De même, la combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimiques (les antioxydants, les nitrites, l'éthanol, les huiles essentielles...) ou physiques a abouti à des résultats prometteurs pour la conservation des aliments. Cependant, ce genre de combinaisons doit être sélectionné soigneusement, afin de

préserver les propriétés organoleptiques de l'aliment (Rodgers, 2004 ; Deegan *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007).

Par ailleurs, une autre contrainte concerne le problème de la résistance que certaines bactéries peuvent développer vis-à-vis des bactériocines comme c'est le cas vis-à-vis des antibiotiques. Cette résistance résulte d'un surdosage ou d'une exposition répétée aux bactériocines. En effet, on peut distinguer trois types de résistants :

- **Résistants naturels** : où l'ensemble des souches appartenant à la même espèce sont naturellement insensibles à la bactériocine sans aucune adaptation portée, c'est le cas notamment de la souche *Leuconostoc citreum* CIP 103405 résistante à la méésentéroïne 52A (Lominet *et al.*, 2002) ;
- **Résistants induits** : où une souche initialement sensible à une bactériocine devient résistante à celle-ci suite à une mutation ou bien à l'expression d'un phénotype de résistance lié à une adaptation (Guinane *et al.*, 2007). En effet, la résistance de *Listeria monocytogenes* à la nisine a été attribuée à des changements de la composition en acides gras membranaires et à des modifications au niveau de la paroi (Kramer *et al.*, 2006; Naghmouchi *et al.*, 2007) ;
- **Résistants immunisés** : Ce type de résistants englobe toutes les souches productrices des peptides antimicrobiens dont les bactériocines. Cette résistance se produit suite à l'expression de protéines d'immunité simultanément à celle des bactériocines. Ainsi, la nisinase, est une protéine produite par certaines souches bactériennes, responsable de l'inactivation la nisine (Klaenhammer, 1993).

Afin de contourner ce problème de résistance aux bactériocines, leur combinaison avec d'autres agents de diverses origines a été préconisée. Ceci devrait permettre d'obtenir des effets additifs voire synergiques des actions des différents agents antimicrobiens vis-à-vis de nombreux pathogènes (Luders *et al.*, 2013).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Echantillonnage

L'isolement des souches de bactéries lactiques a été effectué à partir des produits du terroir (laits, miel, olive, fruits, légumes...) provenant de différentes régions du Maroc. Les prélèvements ont été réalisés sur une période de deux années (la fin 2014 à la fin de 2016). 101 échantillons alimentaires appartenant à différents biotopes et à différentes origines ont été analysés. Il s'agit de laits crus de différentes espèces (37), de Jben (8), de Lben (8), de Raib (4), d'olives fermentées traditionnellement (9), de miel (4), de sol (4), de jus de fruits et de légumes naturels (5), de colostrum (2), de graisse de chamelle (3), d'huile (3), et divers autres sources (11) (beurre, poisson, câpres, intestin de poulet, intestin de mouton...). Tous les échantillons ont été prélevés et transportés au laboratoire dans des conditions aseptiques à 4°C et maintenus à cette même température jusqu'à leur analyse.

Les échantillons alimentaires ont été dilués dans de l'eau physiologique stérile (9‰ NaCl) par à une série de dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-6} , ensuite dix μl de chaque suspension diluée ont étéensemencés par étalement sur gélose MRS coulée auparavant sur boîte de Pétri et incubés à 30°C pendant 24 à 48 h. Les colonies apparaissant après incubation ont subi un test antibactérien direct pour la mise en évidence de leur pouvoir antibactérien.

Les souches indicatrices utilisées pour le test antibactérien direct et indirect et pour le reste de l'étude (mise en évidence de l'activité antibactérienne) sont répertoriées dans le **tableau 4**.

Tableau 4. Souches indicatrices utilisées pour déceler l'activité antibactérienne et établir le spectre d'activité des isolats analysés

Code	Espèce	Référence
E1	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	G6j
E2	<i>Enterococcus columbae</i>	F10d
E3	<i>Enterococcus faecalis</i>	G9h
E4	<i>Enterococcus faecium</i>	G8b
E9	<i>Enterococcus faecalis</i>	OA
E10	<i>Enterococcus faecium</i>	WHE 81
E11	<i>Enterococcus faecium</i>	LC 25
E23	<i>Enterococcus munditii</i>	LC362
E26	<i>Enterococcus raffinosus</i>	LC 361
E29	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
L15	<i>Lactobacillus Saker</i>	ATCC 15521
L17	<i>Lactobacillus lactis</i>	RO50
L18	<i>Lactococcus lactis</i>	WHE 53
L30	<i>Listeria innocua</i>	14 6a!
L31	<i>Listeria innocua</i>	6b
L36	<i>Listeria monocytogenes</i>	3a
L35	<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2C
L37	<i>Listeria monocytogenes</i>	3b
B1	<i>Bacillus cereus</i>	CIP 78.3
LV131	Souche isolée dans cette étude	-
LV1	Souche isolée dans cette étude	-
L3	Souche isolée dans cette étude	-
M3	Souche isolée dans cette étude	-

ATCC : American Type Culture Collection ; **CIP** : Collection de l'Institut Pasteur ;
LC : Collection du Laboratoire

II. Pouvoir antagoniste (test antibactérien)

La détection de l'activité antibactérienne est basée essentiellement sur la diffusion de l'agent antibactérien dans le milieu de culture pour inhiber la croissance bactérienne de la souche indicatrice. La mise en évidence de cette activité a été effectuée d'abord, par le test antibactérien direct (selon la technique de deuxième couche), afin de sélectionner les colonies dotées d'un effet antagoniste et par la suite par le test antibactérien indirect (selon la technique de spot) (Izquierdo *et al.*, 2008 ; Hammi *et al.*, 2016) pour retenir les isolats les plus performants ayant un effet antibactérien reproductible.

1. Test antibactérien direct

Cinq ml du milieu MRS agar liquéfié à 100°C puis refroidi à 50°C ont été inoculés par 0,1% (v/v) d'une culture jeune de la souche indicatrice en fin de phase exponentielle de façon à obtenir une concentration aux alentours de 10^5 UFC/ml. Les colonies qui apparaissent sur la boîte de Pétri lors de l'isolement ont été recouvertes par cette préparation (comme 2^{ème} couche) afin de déceler les colonies dotées d'activité antibactérienne. Les boîtes sont ensuite incubées à nouveau à 30°C pendant 18 h (**Figure 12**).

2. Purification des bactéries

Les colonies ayant montré une zone d'inhibition ont été prélevées pour être purifiées. Cette étape consiste à réaliser des repiquages successifs sur milieu solide jusqu'à l'obtention de colonies identiques par l'aspect et par la couleur. On considère alors que la souche est purifiée.

3. Test antibactérien indirect

Après avoir purifié les colonies ayant montré des zones d'inhibitions, le test antibactérien indirect a été réalisé. La méthode du « *spot on the lawn* » est utilisée et consiste à inoculer un bouillon MRS à environ 10^4 UFC/ml de la souche productrice, à l'incuber à 30°C pendant 18 h, puis à le filtrer à travers une membrane en nitrocellulose ayant une porosité de $0,45\mu\text{m}$ afin d'éliminer les cellules bactériennes. La durée d'incubation de la culture bactérienne ne doit pas dépasser la phase exponentielle de croissance, afin d'éviter la dégradation des bactériocines sous l'effet des protéases.

Des tubes contenant 5 ml de MRS agar ont été portés à ébullition, refroidis à 50°C puisensemencés par la souche indicatrice de la même manière que pour le test direct. La préparation a été coulée comme 2^{ème} couche sur une boîte de Pétri contenant une 1^{ère} couche du milieu MRS

agar stérile. Enfin, 10µl du filtrat obtenu ont été déposés sous forme de spots sur la boîte préparée. L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des gouttes déposées après 18 h à 24 h d'incubation à 30°C (**Figure 12**).

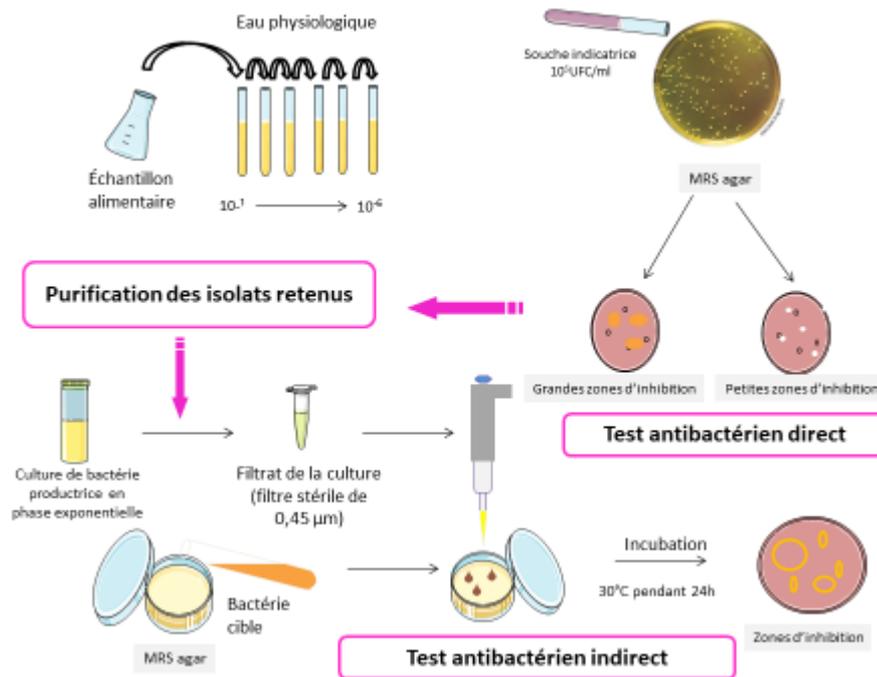


Figure 12. Schéma du test antibactérien direct et indirect

4. Test de la dilution critique

Une série de dilutions en cascade de $\frac{1}{2}$ est réalisée dans de l'eau ultra-pure stérile, puis 10 µl de chaque dilution sont déposés sur une boîte de gélose MRS inoculée d'une culture indicatrice de la même façon que pour le test indirect. Après incubation, l'activité antibactérienne correspond à l'inverse de la plus grande dilution inhibitrice multiplié par 100 exprimée en Unités Arbitraires par ml (UA/ml) (Ennahar *et al.*, 2001 ; Hammi *et al.*, 2016).

5. Spectre d'activité

Afin de déterminer leur spectre d'activité, les bactéries dotées d'activité antibactérienne ont été testées sur une plus large gamme de souches indicatrices. Ce test permet d'une part de donner une idée sur l'activité de l'ensemble des bactériocines de la souche productrice, car une seule souche peut produire plusieurs bactériocines, et d'autre part de faire le bon choix de la souche indicatrice qui sera utilisée pour suivre les différentes étapes de purification.

III. Identification et conservation des bactéries lactiques

1. Identification

Les isolats retenus ont subi des tests microscopiques avant d'être identifiés au niveau de l'espèce par typage par spectrométrie de masse à temps de vol par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS). L'étude de la morphologie bactérienne par microscopie permet de déterminer la forme des bactéries, leur mobilité, leur mode d'association, ainsi que, leur type de Gram qui est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Il est à noter que le choix des souches était basé sur la reproductibilité de la production des bactériocines par les souches retenues.

Les souches d'intérêt qui appartiennent aux bactéries lactiques ont été identifiées au niveau de l'espèce par MALDI-TOF MS effectuée en utilisant un système Bruker Microflex LT, le logiciel Biotyper v. 3.0 et la base de données Bruker v.01.03.66 (Bruker Daltonik, Brème, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. Cette identification a été réalisée au Laboratoire de bactériologie du Plateau Technique de Microbiologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

2. Conservation

Les souches ayant montré un pouvoir antagoniste ont été conservées pour une utilisation ultérieure.

a. Conservation de courte durée

Pour la conservation de courte durée, les souches purifiées ont étéensemencées sur un milieu MRS gélose incliné. Après incubation à 30°C pendant 24 h, les cultures sont maintenues à 4°C au réfrigérateur et le repiquage des souches est effectué toutes les 4 semaines (Badis *et al.*, 2005).

b. Conservation de longue durée

Elle a été effectuée selon deux méthodes ; à -20°C pour une conservation de quelques mois à quelques années et à -80°C pour une conservation de plusieurs années.

- Pour la conservation à -20°C, 70% d'une culture jeune a été mélangée avec 30% de glycérol pour un volume de 1 ml dans un tube Ependorff.
- Pour la conservation à -80°C, après centrifugation de la culture à 5000 tr/min pendant 5 min et élimination du surnageant, 1 ml de la préparation (70% du milieu BHI + 30% de

glycérol) a été rajouté au culot. Après obtention d'un mélange homogène, la solution a été versée dans un cryotube contenant des billes d'adsorption. Après une nuit à 4°C, les tubes sont stockés à -80°C.

NB : les billes utilisées servent à adsorber les cellules bactériennes. En cas de besoin, une seule bille suffit pour faire une nouvelle culture.

IV. Optimisation de conditions expérimentales pour la production des bactériocines

Afin d'optimiser la production des bactériocines par les souches bactériennes retenues, différentes conditions expérimentales ont été testées. A cet effet, des milieux de culture à différents pH initiaux (5,0 à 8,0), à différentes concentrations de NaCl (0%, 1%, 2% et 3%) et à différentes concentrations de l'extrait de levure (0%, 1%, 2% et 3%) ont été utilisés. Les incubations ont été réalisées à trois températures différentes (30°, 37° et 40°C) pendant des durées d'incubation de 10 h à 20 h avec un suivi d'activité au bout de chaque 2 h. La mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits de culture a été déterminée par la méthode du « *spot on the lawn* ». Les résultats obtenus ont été exprimés en fonction du diamètre de la zone d'inhibition (mm).

Trois conditions expérimentales ont été testées pour mesurer l'activité de l'extrait de culture, à savoir : l'effet de la température, l'effet du pH initial et l'effet de la durée d'incubation. Pour suivre la production de bactériocine, le test de la dilution critique décrit précédemment a été utilisé et les résultats obtenus ont été exprimés en UA/ml.

V. Purification des bactériocines

La purification des bactériocines a été effectuée selon un protocole établi par Ennahar (2001). Elle se fait à partir de l'extrait de culture de la souche productrice, en se basant sur le caractère cationique et relativement hydrophobe de celles-ci.

1. Préparation de l'extrait de culture

Avant leur utilisation, les cellules bactériennes ont été revivifiées par deux pré-cultures successives dans un bouillon MRS pendant 18 h à 30°C. Puis, 2 L de bouillon MRS stérile ont été inoculés à 0,1% (v/v) par une culture en phase exponentielle (environ 18 h d'incubation), puis incubés environ 15 h, de façon à récupérer la quasi-totalité de la quantité de bactériocines produites par la souche bactérienne. Ensuite, la culture bactérienne a été centrifugée à 8000

tr/min pendant 30 min à 4°C. A la fin de la centrifugation, le surnageant a été récupéré et ajusté à pH 6,5 avec une solution de NaOH (**Figure 14**).

Généralement, le protocole de purification se fait en quatre étapes : précipitation des protéines, dessalage, passage par un échangeur de cations et purification par HPLC en phase inverse. Dans le présent travail et dans l'objectif d'optimiser ce protocole, nous avons passé directement notre extrait de culture directement sur une colonne échangeuse de cations, sans passer par l'étape de précipitation des bactériocines par le sulfate d'ammonium. En effet, cette étape permet la concentration des bactériocines, mais résulte en des échantillons avec une forte concentration en sel, ce qui affecte l'efficacité du passage sur l'échangeur de cation et nécessite donc une étape supplémentaire, le dessalage. Etant donné que les bactériocines sont des peptides de petite taille, leur précipitation au sulfate d'ammonium représente des risques de perte lors de la purification. Ainsi, dans certain cas, une étape de concentration des bactériocines par précipitation au sulfate d'ammonium suivi par un dessalage, résulte plutôt en une perte qu'en une concentration de la bactériocine.

2. Purification par passage sur un échangeur de cations

La purification des bactériocines est basée essentiellement, sur le caractère cationique de celles-ci. Généralement, elles ont un $pH_i \geq 9$, elles sont donc retenues sur des colonnes échangeuses de cations à des pH proches de la neutralité.

La colonne utilisée (SP-Sépharose HP, longueur 100 mm, diamètre interne 26 mm, taille de particule 34 μ m, Amersham Biosciences), est montée sur une chaîne HPLC basse pression Waters 600 (Waters, St-Quentin, France). Cette colonne a été préalablement équilibrée avec un tampon acétate de sodium 20 mM (Tampon A) à un débit de 5 ml/min. Le pH du tampon A, proche de la neutralité, était modifié selon la bactériocine à purifier. Après passage de 500 ml de l'extrait de culture (Fraction I), la colonne a été lavée avec 200 ml du tampon A au même débit. La solution obtenue après passage de l'extrait de culture et après lavage de la colonne, appelée filtrat, ne contient généralement pas d'activité antibactérienne (**Figure 14**).

Les molécules de bactériocine retenues par la colonne ont été éluées avec 100 à 200 ml du tampon B (tampon A avec NaCl 1M) à un débit de 5ml/min. L'activité antimicrobienne de l'éluat obtenu (Fraction II) a été testée par titrage en utilisant le test de la dilution critique décrit précédemment. Il est à noter qu'après le passage de 500 ml de l'extrait de culture sur la colonne,

les bactériocines retenues ont été éluées avec 100 à 200 ml du tampon B. Ainsi, pour 2L d'extrait de culture, 800 ml d'éluat ont été obtenus.

3. Purification par passage sur une phase stationnaire inverse (C8/C18/ phényl héxyl)

La Fraction II est passée sur une phase inverse comme cela été décrit par Izquierdo *et al* (2008), avec un débit de 4 ml/min sur une colonne semi-préparative C8 de chromatographie en phase inverse (Polaris C8-A, longueur 250 mm, diamètre interne 10 mm, porosité 180 Å, taille de particule 5µm, Varian, Les Ulis, France), montée sur une chaîne HPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific, California, USA) et contrôlée par un logiciel Chromeleon 6.8. Après équilibrage de la colonne avec de l'eau contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA), la fraction II a été chargée, puis un lavage à 20% de l'acétonitrile a été effectué. Les molécules de bactériocine ont ensuite été éluées avec un gradient linéaire d'acétonitrile dans de l'eau distillée contenant 0,1% de TFA à un débit de 4 ml/min, généralement de 20 à 80% d'acétonitrile avec 0,1% de TFA en 30 min. Ce gradient a toutefois dû être légèrement adapté à chaque cas particulier. 70 fractions de 2ml ont été recueillies par un collecteur de fraction placé à la sortie du détecteur UV, qui permet de suivre le profil d'éluion des molécules à 280 nm. (**Figure 14**).

Les fractions montrant une activité antibactérienne maximale ont été passées à un débit de 1 ml/min sur colonne analytique C18 Sunfire (100Å, 5 µm, 250 x 4.6mm, Waters) équilibrée préalablement avec de l'eau contenant 0,1% de TFA. Après injection de la fraction III, L'éluion a été effectuée avec le même gradient que pour la colonne semi-préparative mais à un débit de 1 ml/min. Un détecteur UV permet de suivre le profil d'éluion des molécules à 280 nm. 30 fractions de 200 µl ont été recueillies par un collecteur de fraction placé à la sortie du détecteur. L'activité antibactérienne des fractions obtenues a par la suite été testée (**Figure 14**). Les fractions actives sont réunies (Fraction IV).

A ce niveau, dans le cas où la résolution du pic de la bactériocine est insuffisante, une colonne phényl héxyl (Luna 5 µm, 250 x 4.6mm, Phenomenex, Le Pecq, France) a été utilisée. Cette colonne analytique est montée sur le même système et contrôlée par le même logiciel décrits ci-dessus. La fraction IV a été chargée sur cette colonne équilibrée préalablement avec de l'eau contenant 0,1% de TFA. L'éluion a été effectuée avec un gradient linéaire d'acétonitrile dans de l'eau distillée contenant 0,1% de TFA à un débit de 1 ml/min, de 35 à 80% d'acétonitrile avec 0,1% de TFA en 15 min (gradient A) ou de 20 à 80% d'acétonitrile avec 0,1% de TFA en 30 min (gradient B). Ces deux gradients ont été adaptés à chaque cas

particulier. Comme précédemment, l'activité antibactérienne a été testée par titrage. Les fractions finales contenant les bactériocines purifiées sont séchées sous vide à froid dans un évaporateur SpeedVac (Thermo Scientific) et conservées à -20°C pour la suite de l'étude (Figure 13).



Figure 13. Concentrateur utilisé pour sécher l'ensemble des bactériocines purifiées dans ce travail

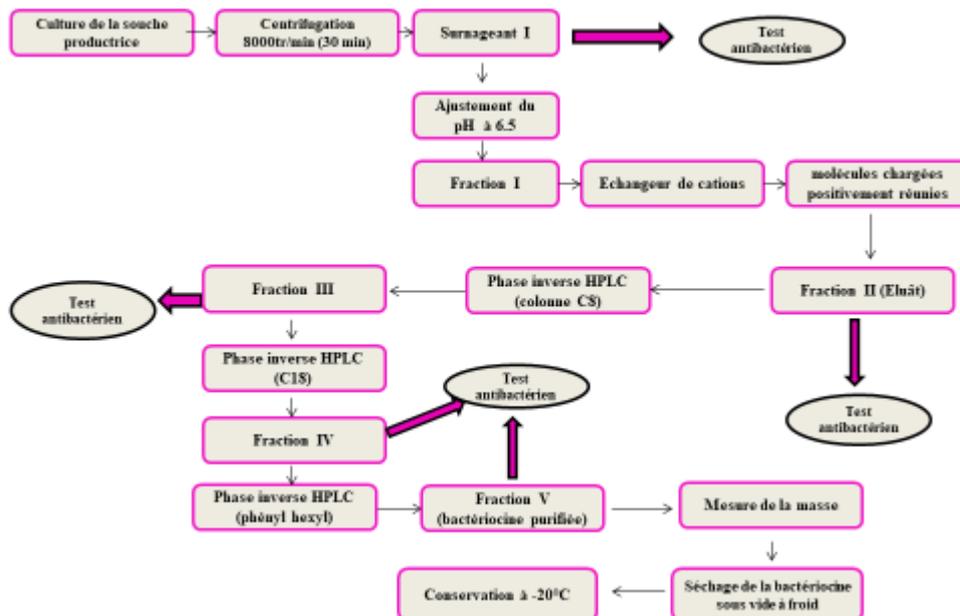


Figure 14. Schéma du protocole utilisé pour la purification des bactériocines

VI. Analyse structurale des bactériocines

1. Mesure de la masse moléculaire par ESI-Q-TOF

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physique permettant la mesure de la masse de l'échantillon, à travers l'ionisation de leurs molécules puis la séparation et la détection des ions, en fonction de leur rapport masse sur charge noté m/z (m étant la masse et z la charge). Dans ce travail, la technique d'ionisation ESI a été adoptée pour la mesure de la masse des bactériocines, car elle est largement utilisée pour l'analyse des macromolécules biologiques, notamment les protéines.

La masse moléculaire de chaque bactériocine purifiée a été déterminée par spectrométrie de masse à source d'ionisation electrospray ESI Q-TOF. Chaque fraction obtenue après la dernière étape de purification par HPLC a été analysée par injection directe à l'aide d'une pompe à seringue sur un spectromètre de masse à temps vol et à source d'ionisation ESI contrôlé par le logiciel micrOTOF Control 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Le couplage de la source d'ionisation avec l'analyseur quadripolaire à temps vol (TOF) permet d'enregistrer des spectres de masse avec de nombreux ions multichargés dans un intervalle de masse/charge (m/z) de 50 à 3000 à travers la mesure du temps de parcours des ions préalablement accélérés dans un champ électrique où règne un vide poussé. La masse moléculaire des bactériocines est calculée à l'aide du logiciel Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics).

2. Séquençage peptidique par la technique de dégradation d'Edman

La détermination de la séquence d'acides aminés a été effectuée par la technique de dégradation d'Edman en faisant interagir le peptide d'intérêt avec le réactif d'Edman (isothiocyanate de phényle (PITC)) à pH alcalin, afin d'identifier l'acide aminé N-terminal du peptide. Cette technique a été réalisée en utilisant un séquenceur en phase gazeux modèle 492 de Applied Biosystems (Numéro de série : 9510287J). Les dérivés d'acides aminés phénylthiohydantoïne générés à chaque cycle de séquence ont été identifiés et quantifiés en ligne avec un système HPLC Applied Biosystems Model 140C en utilisant le système d'analyse de données pour le séquençage de protéines d'Applied Biosystems (logiciel Procise PC v2.1). Le kit standard de PTH-acide aminé (Perkin-Elmer P / N 4340968) a été utilisé et reconstitué conformément aux instructions du fabricant (900776 Rev D). Les procédures et les réactifs utilisés étaient tels que recommandés par le fabricant. La chromatographie a été utilisée pour identifier et quantifier l'acide aminé transformé en dérivé à chaque cycle de séquence. Les

temps de rétention et les valeurs d'intégration des pics ont été comparés au profil chromatographique obtenu pour un mélange standard d'acides aminés dérivés. Les analyses de la détermination de séquence ont été effectuées par J.-P. Andrieu (Institut de Biologie Structurale, CEA / CNRS / UJF, Grenoble, France).

3. Séquençage nucléotidique

L'identification de certaines bactériocines (entérocinés L50A et L50B) a été effectuée par la recherche des gènes de structure. De ce fait, l'amplification de ces gènes chez les souches d'intérêts a été effectuée par PCR en utilisant deux amorces spécifiques (Valenzuela *et al.*, 2009). Les produits de la PCR ont été ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose afin de confirmer la présence du gène codant pour la bactériocine recherchée. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été identifiées en utilisant la base de données NCBI-Blast (**Tableau 5**).

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Tableau 5. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes de structure des entérocinés L50A et L50B par PCR

	Séquences Oligonucléotidiques	Références
Entérociné L50A	TGGGAGCAATCGCAAATTAG	Du Toit <i>et al.</i> (2000)
Entérociné L50B	ATTGCCCATCCTTCTCCAAT	Du Toit <i>et al.</i> (2000)

VII. Activité des bactériocines purifiées vis à vis de pathogènes alimentaires (CMI en $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

Parmi les bactériocines identifiées, deux (B1 et B2) ont été testées vis-à-vis d'une gamme de bactéries pathogènes d'origine alimentaire. La détermination de la concentration minimale inhibitrice des bactériocines B1 et B2 seules et en combinaison a été effectuée par la technique de dilution en cascade de $\frac{1}{2}$ de la solution pure de la bactériocine dans de l'eau ultra pure stérile. Différentes concentrations (2000 ; 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,2 ; 15,6 et 7,8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) des deux bactériocines purifiées ont été testées vis-à-vis de : *Enterococcus casseliflavus* E1, *Enterococcus columbae* E2, *Enterococcus faecalis* E3, *Enterococcus faecium* E4, *Enterococcus*

faecium E10, *Enterococcus faecium* E11, *Escherichia coli* E29, *Salmonella enteridis* S1, *Staphylococcus aureus* S5, *Staphylococcus epidermidis* S7, *Staphylococcus xylosus* S8, *Listeria innocua* L30, *Listeria innocua* L31, *Listeria monocytogenes 3a* L36, *Listeria monocytogenes 3b* L37 et de *Bacillus cereus* B1. Dix µl de chaque solution diluée ont été soumis au test antibactérien indirect comme décrit précédemment.

VIII. Etude de l'activité de différents antimicrobiens (bactériocines purifiées et antibiotiques) vis-à-vis de pathogènes multi-résistants issus de milieux biologiques humains

Un échantillonnage a été effectué à partir de liquides biologiques humains dans un laboratoire d'analyses médicales afin de collecter des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques et de tester l'effet des bactériocines purifiées, seules ou en combinaison avec des antibiotiques sur ces germes pathogènes.

1. Collecte et identification de bactéries pathogènes d'origine humaine multi-résistantes aux antibiotiques

L'isolement de bactéries multi-résistantes a été effectué à partir de liquides biologiques humains : urine, selles, sang, crachât, ... Chaque échantillon a subi une dilution de 1/10 dans de l'eau physiologique pour une identification microscopique préliminaire à l'état frais et après une coloration de Gram, puis une identification sur milieu sélectif, ce qui permet de déterminer la nature du germe isolé (**Tableau 6**). Les isolats ont par la suite été purifiés par repiquages successifs sur milieu gélosé et testés par antibiogramme.

Tableau 6. Identification des germes en fonction de la couleur des colonies sur milieu sélectif

Germe	Milieu de culture	Couleur des colonies
<i>Escherichia coli</i>	Cled	Jaunâtre
	Brillance	Rose
	Chocolat	Blanchâtre/ beige
	Mac-conkey	Rose
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cled	Jaune
	Mac-conkey	Rose
	Brillance	Mauve
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Chocolat	Beige
	Brillance	Beige
	Mac-conkey	Rose pâle
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman	Jaune/Blanc
	Cled	Jaune
	Brillance	Mauve
<i>Salmonella spp</i>	Hektoene	Verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mac-conkey	Beige/ Marron
	Brillance	Verte
<i>Enterococcus faecalis</i>	Brillance	Turquoise
	Bille Esculine	Noir
	Cled	Jaune

2. Antibiogramme

La technique d'antibiogramme consiste à caractériser la sensibilité ou la résistance des isolats cliniques vis-à-vis de divers antibiotiques appartenant à différentes familles en fonction de l'espèce à tester. Elle consiste à prélever quatre à cinq colonies similaires collectées à partir d'une culture jeune et transférées dans une solution saline appropriée pour obtenir une turbidité équivalente à l'étalon de sulfate de baryum 0,5 McFarland. L'inoculum obtenu a ensuite été étalé par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton agar (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Par la suite, les disques d'antibiotiques ont été déposés sur la gélose inoculée. Après une incubation de 24 h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques ont été mesurés. Les souches ont été classées comme sensibles, intermédiaires ou résistantes selon la norme « Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie CA-SFM /EUCAST » (Jehl *et al.*, 2019) :

- **Bactérie sensible** : Diamètre de zone d'inhibition supérieur ou égale la valeur critique recommandée (diamètre de la zone varie d'une espèce à l'autre).

- **Bactérie intermédiaire** : Diamètre de zone d'inhibition est entre la valeur critique minimale et maximale recommandée (diamètre dépend de l'espèce).
- **Bactérie résistante** : Diamètre de zone d'inhibition est inférieur de la valeur critique recommandée.

3. Activité des antibiotiques par micro dilutions sur les BMRe sélectionnées

D'après les antibiogrammes obtenus, huit antibiotiques appartenant à différentes familles ont été retenus en fonction de leur activité (inefficacité) vis-à-vis des souches pathogènes les plus résistantes (**Tableau 7**).

Tableau 7. Classification des huit antibiotiques sélectionnés

Famille	Sous famille	Groupe	Antibiotique	Code	Charge du disque*
β-lactamines	Amino-pénicillines	G	Pénicilline G	P	6,25µg
		A	Ampicilline	AMP	10µg
			Amoxicilline	AMX	25µg
	Céphalosporines	I	Céfaclor	CEC	30µg
		III	Céfotaxime	CTX	30µg
			Céfixime	CFM	5µg
Aminosides			Gentamycine	GM	15µg
Quinolones			Ciprofloxacine	CIP	5µg

*La charge du disque : correspond à la quantité de l'antibiotique en µg

L'activité antibactérienne a été testée à différentes concentrations par la technique de dilution critique de 1/2. Les antibiotiques ont été dissous dans de l'eau distillée stérile, puis soumis à une série de dilutions en cascade de 1/2 à partir de la solution de l'antibiotique pure (l'amoxicilline de 200 à 1,56 µg.ml⁻¹ ; l'ampicilline de 80 à 0,625 µg.ml⁻¹ ; le céfaclor de 240 à 1,87 µg.ml⁻¹ ; le céfotaxime de 240 à 1,87 µg.ml⁻¹ ; le cefixime de 40 à 0,312 µg.ml⁻¹ ; la ciprofloxacine de 40 à 0,312 µg.ml⁻¹ ; la gentamycine de 120 à 0,93 µg.ml⁻¹ et la pénicilline G de 53 à 0,4 µg.ml⁻¹) (**Tableau 8**). Ensuite, dix µl de chaque dilution ont été déposés sur la souche pathogène testée via le test antibactérien indirect décrit précédemment « *spot on the lawn* ». La CMI est définie comme étant la plus faible concentration où l'inhibition de la croissance bactérienne est visible.

Tableau 8. Exemple de préparation d'une plaque de titrage d'antibiotiques à partir de la solution mère

Volume	Pénicilline G P	Ampicilline AMP	Amoxicilline AMX	Ciprofloxacine CIP	Céfaclor CEC	Gentamycine GN	Céfotaxime CTX	Céfixime CFM
	µg.ml ⁻¹							
A= 100µl	53	80	200	40	240	120	240	40
B=100µlA+100µl EDS	26,5	40	100	20	120	60	120	20
C=100µlB+100µlEDS	13,25	20	50	10	60	30	60	10
*D=100µl C+100µl EDS	6,62	10	25	5	30	15	30	5
E=100µl D+100µl EDS	3,31	5	12,5	2,5	15	7,5	15	2,5
F=100µl E+ 100µl EDS	1,65	2,5	6,25	1,25	7,5	3,75	7,5	1,25
G=100 µl F+ 100µl EDS	0,82	1,25	3,125	0,625	3,75	1,87	3,75	0,625
H=100 µl G+ 100µl EDS	0,41	0,625	1,56	0,312	1,87	0,93	1,87	0,312

*La dilution D correspond à la charge du disque ; EDS : Eau Distillée Stérile.

4. Activité des bactériocines purifiées par micro dilutions sur les BMRe sélectionnées

L'activité antibactérienne de l'ensemble des bactériocines purifiées a été étudiée vis-à-vis des souches isolées multi-résistantes aux antibiotiques. Les bactériocines ont été dissoutes dans de l'eau distillée stérile, puis soumises à une série de dilutions en cascade de ½ à partir de la solution mère. Ensuite, dix µl de chaque dilution ont été déposés sur la souche pathogène testée via le même test antibactérien décrit ci-dessus « *spot on the lawn* ». La CMI est déterminée pour l'ensemble des bactériocines pures seules et/ou en combinaison par des dilutions en cascade de ½ à partir de la solution de la bactériocine pure de 1000 à 0,06 µg.ml⁻¹ (Tableau 9).

Tableau 9. Exemple de la préparation d'une plaque de titrage de deux bactériocines pures seules et en combinaison

Concentration en $\mu\text{g.ml}^{-1}$	1	2	3
A= 1000	(200 μl A)	(200 μl A)	(100 μl A1+100 μl A2)
B=500	(100 μl A1 + 100 μl EDS)	(100 μl A2 + 100 μl EDS)	(50 μl A1+50 μl A2) + 100 μl EDS)
C=250	(100 μl B1 + 100 μl EDS)	(100 μl B2+ 100 μl EDS)	(100 μl B3 + 100 μl EDS)
D=125	(100 μl C1+ 100 μl EDS)	(100 μl C2 + 100 μl EDS)	(100 μl C3 + 100 μl EDS)
E=62,5	(100 μl D1 + 100 μl EDS)	(100 μl D2 + 100 μl EDS)	(100 μl D3 + 100 μl EDS)
F=31,2	(100 μl E1 + 100 μl EDS)	(100 μl E2 + 100 μl EDS)	(100 μl E3 + 100 μl EDS)
G=15,6	(100 μl F1 + 100 μl EDS)	(100 μl F2 + 100 μl EDS)	(100 μl F3 + 100 μl EDS)
H=7,8	(100 μl G1 + 100 μl EDS)	(100 μl G2 + 100 μl EDS)	(100 μl G3 + 100 μl EDS)
I=3,90	(100 μl H1 + 100 μl EDS)	(100 μl H2 + 100 μl EDS)	(100 μl H3 + 100 μl EDS)
J= 1,95	(100 μl I1 + 100 μl EDS)	(100 μl I2 + 100 μl EDS)	(100 μl I3 + 100 μl EDS)
K= 0,97	(100 μl J1 + 100 μl EDS)	(100 μl J2 + 100 μl EDS)	(100 μl J3 + 100 μl EDS)
L= 0,48	(100 μl K1 + 100 μl EDS)	(100 μl K2 + 100 μl EDS)	(100 μl K3 + 100 μl EDS)
M=0,24	(100 μl L1 + 100 μl EDS)	(100 μl L2 + 100 μl EDS)	(100 μl L3 + 100 μl EDS)
N= 0,12	(100 μl M1 + 100 μl EDS)	(100 μl M2 + 100 μl EDS)	(100 μl M3 + 100 μl EDS)
O=0,06	(100 μl N1 + 100 μl EDS)	(100 μl N2 + 100 μl EDS)	(100 μl N3 + 100 μl EDS)

1 : bactériocine numéro 1 ; **2** : bactériocine numéro 2 ; **3** : combinaison des deux bactériocines 1+2 ;
EDS : Eau Distillée Stérile.

5. Activité des combinaisons bactériocine/antibiotique sur les **BMRe** sélectionnées

Les huit antibiotiques purs testés ont été combinés avec l'ensemble des bactériocines purifiées à différentes concentrations afin de tester l'effet potentialisateur et/ou synergique des deux agents antimicrobiens vis-à-vis des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques. De ce fait, différentes combinaisons ont été préparées par une série de dilutions en cascade de $\frac{1}{2}$ à partir de la solution pure de la bactériocine de 500 à 1,95 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et de la solution pure de l'antibiotique à savoir : l'amoxicilline de 25 à 0,003 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Tableau 10**), l'ampicilline de 10 à 0,001 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, le céfaclor 30 à 0,003 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, le céfotaxime de 30 à 0,003 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, le cefixime de 5 à 0,0006 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, la ciprofloxacine de 5 à 0,0006 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, la gentamycine de 15 à 0,01 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, et la pénicilline G de 6,25 à 0,0006 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Ensuite, dix μl de chaque combinaison ont été déposés sur la souche pathogène testée via le même test antibactérien décrit préalablement

« *spot on the lawn* ». La préparation des combinaisons a été effectuée selon la technique de la dilution en damier (Tong *et al.*, 2014) comme illustré au **tableau 11**.

Tableau 10. Exemple de la préparation d'une plaque de titrage de la combinaison bactériocine/antibiotique (amoxicilline)

Bactériocine $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Amoxicilline $\mu\text{g.ml}^{-1}$		
	50	25	12,5
A= 1000	100 μl (A) +100 μl (50)	100 μl (A) +100 μl (25)	100 μl (A) +100 μl (12,5)
B= 500	50 μl (A) +50 μl (50)+100 μl EDS	50 μl (A) +50 μl (25)+100 μl EDS	50 μl (A) +50 μl (12,5)+100 μl EDS
C= 250	100 μl (B50) + 100 μl EDS	100 μl (B25) + 100 μl EDS	100 μl (B12,5) + 100 μl EDS
D= 125	100 μl (C50) + 100 μl EDS	100 μl (C25) + 100 μl EDS	100 μl (C12,5) + 100 μl EDS
E= 62,5	100 μl (D50) + 100 μl EDS	100 μl (D25) + 100 μl EDS	100 μl (D12,5) + 100 μl EDS
F= 31,2	100 μl (E50) + 100 μl EDS	100 μl (E25) + 100 μl EDS	100 μl (E12,5) + 100 μl EDS
G= 15,6	100 μl (F50) + 100 μl EDS	100 μl (F25) + 100 μl EDS	100 μl (F12,5) + 100 μl EDS
H= 7,8	100 μl (G50) + 100 μl EDS	100 μl (G25) + 100 μl EDS	100 μl (G12,5) + 100 μl EDS

EDS : Eau Distillée Stérile ; **50** correspond à la première série de combinaisons qui commence à partir de la concentration 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de l'amoxicilline avec la bactériocine ; **25** correspond à la deuxième série de combinaisons qui commence à partir de la concentration 12,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de l'amoxicilline et **12,5** correspond à la troisième série de combinaisons qui commence à partir de la concentration 6,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de l'amoxicilline.

Pour chaque concentration d'un agent antimicrobien, trois combinaisons ont été testées avec le deuxième, comme le montre le tableau 11 et 12 (la concentration de la bactériocine est stable à l'horizontale (trait rouge), et celle de l'antibiotique est stable à la diagonale (trait bleu)). La correspondance de toutes les dilutions préparées suite à la combinaison antibiotique/bactériocine en concentration ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) est mentionnée aux **tableaux 11 et 12**.

Tableau 11. Concentrations en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des combinaisons antibiotique/bactériocine à partir d'une solution mère à $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de la bactériocine pure

Bactériocine $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Ampécilline			Amoxicilline			Ciprofloxacine / Céfixime			Céfaclor / Céfotaxime			Gentamycine			Pénicilline			
	20	10	5	50	25	12,5	10	5	2,5	60	30	15	30	15	7,5	0,0125	0,00625	0,003125	
A	1000	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	
		10	5	2,5	25	12,5	6,25	5	2,5	1,25	30	15	7,5	15	7,5	3,75	0,00625	0,003125	0,001563
B	500	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	
		5	2,5	1,25	12,5	6,25	3,125	2,5	1,25	0,625	15	7,5	3,75	7,5	3,75	1,875	0,003125	0,001563	0,000781
C	250	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	
		2,5	1,25	0,625	6,25	3,125	1,5625	1,25	0,625	0,3125	7,5	3,75	1,875	3,75	1,875	0,9375	0,001563	0,000781	0,000391
D	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	
		1,25	0,625	0,3125	3,125	1,5625	0,78125	0,625	0,3125	0,15625	3,75	1,875	0,9375	1,875	0,9375	0,46875	0,000781	0,000391	0,000195
E	62,5	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	
		0,625	0,3125	0,15625	1,5625	0,78125	0,390625	0,3125	0,15625	0,078125	1,875	0,9375	0,46875	0,9375	0,46875	0,234375	0,000391	0,000195	0,0000977
F	31,25	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	
		0,3125	0,15625	0,078125	0,78125	0,390625	0,195313	0,15625	0,078125	0,039063	0,9375	0,46875	0,234375	0,46875	0,234375	0,117188	0,000195	0,0000977	0,0000488
G	15,625	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	7,8125	
		0,15625	0,078125	0,039063	0,390625	0,195313	0,097656	0,078125	0,039063	0,019531	0,46875	0,234375	0,117188	0,234375	0,117188	0,058594	0,0000977	0,0000488	0,0000244
H	7,8125	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	3,90625	
		0,078125	0,039063	0,019531	0,195313	0,097656	0,048828	0,039063	0,019531	0,009766	0,234375	0,117188	0,058594	0,117188	0,058594	0,029297	0,0000488	0,0000244	0,0000122
I	3,90625	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	1,953125	
		0,039063	0,019531	0,009766	0,097656	0,048828	0,024414	0,019531	0,009766	0,004883	0,117188	0,058594	0,029297	0,058594	0,029297	0,014648	0,0000244	0,0000122	0,0000061
J	1,953125	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	0,976563	
		0,019531	0,009766	0,004883	0,048828	0,024414	0,012207	0,009766	0,004883	0,002441	0,058594	0,029297	0,014648	0,029297	0,014648	0,007324	0,0000122	0,0000061	0,00000305
K	0,976563	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	0,488281	
		0,009766	0,004883	0,002441	0,024414	0,012207	0,006104	0,004883	0,002441	0,001221	0,029297	0,014648	0,007324	0,014648	0,007324	0,003662	0,0000061	0,00000305	0,00000153
L	0,488281	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	0,244141	
		0,004883	0,002441	0,001221	0,012207	0,006104	0,003052	0,002441	0,001221	0,00061	0,014648	0,007324	0,003662	0,007324	0,003662	0,001831	0,00000305	0,00000153	0,000000763
M	0,244141	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	0,12207	
		0,002441	0,001221	0,00061	0,006104	0,003052	0,001526	0,001221	0,00061	0,000305	0,007324	0,003662	0,001831	0,003662	0,001831	0,000916	0,00000153	0,000000763	0,000000381
N	0,12207	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	0,061035	
		0,001221	0,00061	0,000305	0,003052	0,001526	0,000763	0,00061	0,000305	0,000153	0,003662	0,001831	0,000916	0,003662	0,001831	0,000458	0,000000763	0,000000381	0,000000191

Tableau 12. Concentrations en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des combinaisons antibiotique/bactériocine à partir d'une solution mère à $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de la bactériocine pure

Bactériocine $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Ampécilline			Amoxicilline			Ciprofloxacine / Céfixime			Céfacor / Céfotaxime			Gentamycine			Pénicilline			
	20	10	5	50	25	12,5	10	5	2,5	60	30	15	30	15	7,5	0,0125	0,00625	0,003125	
A	500	250 10	250 5	250 2,5	250 25	250 12,5	250 6,25	250 5	250 2,5	250 1,25	250 30	250 15	250 7,5	250 15	250 7,5	250 3,75	250 0,00625	250 0,003125	250 0,001563
B	250	125 5	125 2,5	125 1,25	125 12,5	125 6,25	125 3,125	125 2,5	125 1,25	125 0,625	125 15	125 7,5	125 3,75	125 7,5	125 3,75	125 1,875	125 0,003125	125 0,001563	125 0,000781
C	125	62,5 2,5	62,5 1,25	62,5 0,625	62,5 6,25	62,5 3,125	62,5 1,5625	62,5 1,25	62,5 0,625	62,5 0,3125	62,5 7,5	62,5 3,75	62,5 1,875	62,5 3,75	62,5 1,875	62,5 0,9375	62,5 0,001563	62,5 0,000781	62,5 0,000391
D	62,5	31,25 1,25	31,25 0,625	31,25 0,3125	31,25 3,125	31,25 1,5625	31,25 0,78125	31,25 0,625	31,25 0,3125	31,25 0,15625	31,25 3,75	31,25 1,875	31,25 0,9375	31,25 1,875	31,25 0,9375	31,25 0,46875	31,25 0,000781	31,25 0,000391	31,25 0,000195
E	31,25	15,625 0,625	15,625 0,3125	15,625 0,15625	15,625 1,5625	15,625 0,78125	15,625 0,390625	15,625 0,3125	15,625 0,15625	15,625 0,078125	15,625 1,875	15,625 0,9375	15,625 0,46875	15,625 0,9375	15,625 0,46875	15,625 0,234375	15,625 0,000391	15,625 0,000195	15,625 0,0000977
F	15,625	7,8125 0,3125	7,8125 0,15625	7,8125 0,078125	7,8125 0,78125	7,8125 0,390625	7,8125 0,195313	7,8125 0,15625	7,8125 0,078125	7,8125 0,039063	7,8125 0,9375	7,8125 0,46875	7,8125 0,234375	7,8125 0,46875	7,8125 0,234375	7,8125 0,117188	7,8125 0,000195	7,8125 0,0000977	7,8125 0,0000488
G	7,8125	3,90625 0,15625	3,90625 0,078125	3,90625 0,039063	3,90625 0,390625	3,90625 0,195313	3,90625 0,097656	3,90625 0,078125	3,90625 0,039063	3,90625 0,019531	3,90625 0,46875	3,90625 0,234375	3,90625 0,117188	3,90625 0,234375	3,90625 0,117188	3,90625 0,058594	3,90625 0,0000977	3,90625 0,0000488	3,90625 0,0000244
H	3,90625	1,953125 0,078125	1,953125 0,039063	1,953125 0,019531	1,953125 0,195313	1,953125 0,097656	1,953125 0,048828	1,953125 0,039063	1,953125 0,019531	1,953125 0,009766	1,953125 0,234375	1,953125 0,117188	1,953125 0,058594	1,953125 0,117188	1,953125 0,058594	1,953125 0,029297	1,953125 0,0000488	1,953125 0,0000244	1,953125 0,0000122
I	1,953125	0,976563 0,039063	0,976563 0,019531	0,976563 0,009766	0,976563 0,097656	0,976563 0,048828	0,976563 0,024414	0,976563 0,019531	0,976563 0,009766	0,976563 0,004883	0,976563 0,117188	0,976563 0,058594	0,976563 0,029297	0,976563 0,058594	0,976563 0,029297	0,976563 0,014648	0,976563 0,0000244	0,976563 0,0000122	0,976563 0,0000061
J	0,976563	0,488281 0,019531	0,488281 0,009766	0,488281 0,004883	0,488281 0,048828	0,488281 0,024414	0,488281 0,012207	0,488281 0,009766	0,488281 0,004883	0,488281 0,002441	0,488281 0,058594	0,488281 0,029297	0,488281 0,014648	0,488281 0,029297	0,488281 0,014648	0,488281 0,007324	0,488281 0,0000122	0,488281 0,0000061	0,488281 0,00000305
K	0,488281	0,244141 0,009766	0,244141 0,004883	0,244141 0,002441	0,244141 0,024414	0,244141 0,012207	0,244141 0,006104	0,244141 0,004883	0,244141 0,002441	0,244141 0,001221	0,244141 0,029297	0,244141 0,014648	0,244141 0,007324	0,244141 0,014648	0,244141 0,007324	0,244141 0,003662	0,244141 0,0000061	0,244141 0,00000305	0,244141 0,00000153
L	0,244141	0,12207 0,004883	0,12207 0,002441	0,12207 0,001221	0,12207 0,012207	0,12207 0,006104	0,12207 0,003052	0,12207 0,002441	0,12207 0,001221	0,12207 0,00061	0,12207 0,014648	0,12207 0,007324	0,12207 0,003662	0,12207 0,007324	0,12207 0,003662	0,12207 0,001831	0,12207 0,00000305	0,12207 0,00000153	0,12207 0,000000763
M	0,12207	0,061035 0,002441	0,061035 0,001221	0,061035 0,00061	0,061035 0,006104	0,061035 0,003052	0,061035 0,001526	0,061035 0,001221	0,061035 0,00061	0,061035 0,000305	0,061035 0,007324	0,061035 0,003662	0,061035 0,001831	0,061035 0,003662	0,061035 0,001831	0,061035 0,000916	0,061035 0,00000153	0,061035 0,000000763	0,061035 0,000000381
N	0,061035	0,03051 0,001221	0,03051 0,00061	0,03051 0,000305	0,03051 0,003052	0,03051 0,001526	0,03051 0,000763	0,03051 0,00061	0,03051 0,000305	0,03051 0,000153	0,03051 0,003662	0,03051 0,001831	0,03051 0,000916	0,03051 0,003662	0,03051 0,001831	0,03051 0,000458	0,03051 0,000000763	0,03051 0,000000381	0,03051 0,000000191

***CHAPITRE III : RESULTATS ET
DISCUSSION***

I. Echantillonnage

Un échantillonnage a été effectué à partir de produits alimentaires (lait, miel, olives, fruits, légumes...), provenant de différentes régions du Maroc. Au total, 215 isolats ont été obtenus à partir de 101 échantillons alimentaires analysés. A l'issue d'une première identification macroscopique, microscopique et biochimique, 71 isolats appartenant aux bactéries lactiques (Gram positif, catalase négative, immobiles et se présentant sous forme coques ou bacilles) ont été retenus (**Tableau 13**).

Tableau 13. Nature et origine des échantillons alimentaires analysés

Type d'échantillons	Nature	Origine	Code
Lait	Lait de vache	Taounat	LV1
		Taounat	LV2
		Taounat	LV3
		Menzel	LV4
		Agadir	LV5
		Agadir	LV6
		Agadir	LV7
		Taounat	LV8
		Bhalil	LV9
		Fès	LV10
		Oued amlil	LV11
		Fès	LV12
		Taza	LV13
		Sefrou	LV14
		Fès	LV15
		Fès	LV16
		Fès	LV120
		Salé	LV18
		Salé	LV19
		Rabat	LV20
		Bir tamtam	LV21
		Salé	LV22
		Assilah	LV23
		Bouqnadel	LV24
		Sefrou	LV25
		Fès	LV26
		Fès	LV27
Lait de brebis	Menzel	LB1	
	Fès	LB2	
Lait de chamelle	Laâyoun	LC1	
	Dakhla	LC2	
	Dakhla	LC3	
	Dakhla	LC4	
	Dakhla	LC5	
	Dakhla	LC6	
Lait de chèvre	Ifrane	LCr1	
Lait de maman	Fès	LM1	
Lben	Fès	L1	

Produits laitiers traditionnels		Rachidia	L2
		Taza	L31
		Agadir	L4
		Agadir	L5
		Salé	L6
		Salé	L7
		Bouqnadel	L8
		Fès	J1
	Jben	Chafchaouen	J2
		Fès	J3
		Fès	J4
		Fès	J5
		Fès	J6
		Fès	J7
		Fès	J8
	Raib	Salé	R1
		Taza	R2
Tanger		R3	
Salé		R4	
Olives	Olives noires	Fès	ON1
		Fès	ON2
		Fès	ON3
	Saumure d'olives fermentées	Fès	EO1
		Taza	EO2
		Taounat	EO3
		Azrou	EO24
		Fès	EO4
		Fès	EO5
Divers	Miel	Mohamedia	M1
		Mohamedia	M2
		Rabat	M3
		Mohamedia	M4
	Sol	Taounat	S1
		Taounat	S2
		Taounat	S3
		Fès	S4
	Jus de tomate	Fès	JT1
	Jus de betterave	Fès	JB1
	Jus de pastèque	Fès	JP1
	Jus d'abricot	Fès	JA1
	Jus de fraise	Fès	JF1
	Colostrum de vache	Taounat	CL1
		Taounat	CL2
	Graisse de chamelle	Laâyoun	GC1
		Laâyoun	GC2
		Dakhla	GC3
	Huile d'argan	Agadir	HA1
		Agadir	HA2
		Agadir	HA3
	Huile d'olive	Fès	HO1
	Oignon	Fès	O1
	Eau de citron	Azrou	EC
	Beurre	Taounat	B1

	Câpres	Fès	Ca1
	Sardines	El houceima	EPS
	Pageots	El houceima	EPP
	Intestin de mouton	Fès	IM
	Intestin de poulet	Fès	IP
	Pulpe oignon	Fès	O2
	Pulpe pomme	Fès	PP
	Semoule	Taounat	Se1
	Dinde fumée	Fès	DF1
Autres	Fromage : Munster	Strasbourg	L3
	Ensilage	Strasbourg	17

II. Pouvoir antagoniste (test antibactérien)

1. Test direct

La mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'ensemble des échantillons analysés a été réalisée par les tests antibactériens direct et indirect. Le résultat se traduit par l'apparition de zones d'inhibition dans une culture en gélose autour des colonies d'intérêt (test direct) (**Figure 15**) et autour des surnageants de cultures (test indirect) (**Figure 16**). Le test antibactérien indirect permet notamment de confirmer la production des bactériocines par les isolats retenus et de sélectionner les souches productrices les plus performantes.



Figure 15. Exemple de zones d'inhibition obtenues autour des colonies lors du test antibactérien direct

Ces tests nous ont permis de sélectionner 22 souches dotées d'une activité antibactérienne (**Tableau 14**), dont cinq ont fait l'objet d'une purification de la substance active.

Tableau 14. Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne à travers les tests antibactériens direct et indirect

Effet antibactérien			Effet antibactérien			Effet antibactérien		
Code	Test direct	Test indirect	Code	Test direct	Test indirect	Code	Test direct	Test indirect
<u>LV1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	<u>LB1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LV14	Non	Non
L1	Non	Non	L2	Non	Non	<u>J7</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>
J1	Non	Non	LV5	Oui	Non	EPS	Oui	Non
LV2	Oui	Non	LV6	Oui	Non	EPP	Oui	Non
JT1	Non	Non	<u>LC4</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	<u>EO24</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>
Se1	Non	Non	LC5	Oui	Non	LV15	Oui	Non
LV3	Oui	Non	LC6	Oui	Non	LV16	Oui	Non
<u>B1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	<u>L3</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	<u>LV120</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>
<u>B11</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	M2	Non	Non	EO4	Oui	Non
CL1	Oui	Non	<u>Ca1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	<u>LV18</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>
EO1	Oui	Non	<u>LV7</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LV19	Non	Non
JB1	Oui	Non	L4	Oui	Non	LV20	Oui	Non
LC1	Oui	Non	<u>M3</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LV22	Oui	Non
<u>JP1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LM1	Non	Non	LV23	Oui	Non
ON1	Oui	Non	S1	Non	Non	R2	Oui	Non
CL2	Oui	Non	S2	Non	Non	L8	Oui	Non
<u>M1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	S3	Oui	Non	LV25	Oui	Non
<u>LC2</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	EO3	Oui	Non	<u>LV26</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>
LC3	Oui	Non	LV8	Oui	Non	LV27	Non	Non
<u>GC1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LV9	Oui	Non	LB2	Non	Non
<u>GC2</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LV10	Oui	Non	EO5	Oui	Non
GC3	Non	Non	LV11	Non	Non	M4	Non	Non
<u>LV4</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LV12	Non	Non	<u>LCr1</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>
<u>LV41</u>	<u>Oui</u>	<u>Oui</u>	LV13	Non	Non			



Figure 16. Exemple de zone d'inhibition obtenue autour des spots déposés. Les spots de A à E' correspondent aux extraits de culture de différents isolats testés

2. Spectre d'activité

Les spectres d'activité des isolats ayant montré un effet antibactérien reproductible ont été établis en utilisant sept souches indicatrices. Les souches retenues sont : JP1, LC2, LV4, EO24 et LV120 (**Tableau 15**). En effet, ce sont celles qui ont montré les plus larges zones d'inhibition et ceci vis-à-vis d'un plus grand nombre de souches indicatrices à savoir : *Enterococcus raffinosus* E26, *Lactococcus lactis* L17, *Lactobacillus sakei* L15, *Lactobacillus plantarum* L3 et les souches M3, LV1 et LV132 (non encore identifiées).

Tableau 15. Spectre d'activité des souches à effet antibactérien reproductible vis-à-vis d'une gamme de souches indicatrices. Les zones d'inhibitions sont exprimées en mm

Code	Souches indicatrices						
	<i>Enterococcus raffinosus</i> E26	<i>Lactococcus lactis</i> L17	<i>Lactobacillus sakei</i> L15	M3	L3	LV1	LV132
LV1	9	5~	0	0	0	0	ND
B1	0	0	8~	0	0	0	ND
B11	7	0	0	0	0	11~	ND
JP1	10	6~	10	8	9	0	12
M1	0	0	0	6~	0	0	ND
LC2	8	8	10	9	7	0	6~
GC1	9	6~	0	0	0	0	ND
GC2	6	0	0	0	11	0	ND
LV4	16	13	5	0	9	7	14
LV41	0	0	0	6~	0	0	ND
LB1	0	0	0	8~	0	9	ND
LC4	8	0	0	0	0	6	ND
L3	0	4~	0	8	0	0	ND
Ca1	8	6	0	0	0	0	ND
EO24	12	7	5~	0	0	10	16
LV120	14	9	5~	0	0	12	14
LCr1	0	7	0	0	0	8	ND
M3	9	5~	0	0	0	0	ND
LV7	5~	0	0	0	0	0	0
J7	8	0	0	0	0	0	6~
LV18	0	0	0	0	0	0	8~
LV28	7	0	0	0	0	0	7

M3, L3, LV1 et LV132 : souches non identifiées. ND : Non Déterminé, (~) zone trouble.

III. Identification des bactéries lactiques

Les résultats des identifications macroscopique et microscopique préalablement réalisées avaient montré que les cinq souches sélectionnées LC2, LV4, JP1, EO24 et LV120 sont des

bactéries lactiques. L'identification par Maldi-TOF-MS, a montré que les souches LV4, LC2 et JP1 correspondaient à l'espèce « *Enterococcus durans* » et que les souches EO24 et LV120 correspondaient à l'espèce « *Lactococcus lactis* » (**Tableau 16**). Deux autres souches productrices de bactériocines, préalablement isolées et identifiées au laboratoire ; *Lactococcus lactis* L17 et *Lactobacillus plantarum* L3 ont également été étudiées (**Tableau 16**).

Tableau 16. Identification des souches retenues dotées d'activité antibactérienne

Code	Espèce identifiée	Origine	Technique
LC2	<i>Enterococcus durans</i>	Lait de chamelle	Spectrométrie de masse
LV4	<i>Enterococcus durans</i>	Lait de vache	Spectrométrie de masse
JP1	<i>Enterococcus durans</i>	Jus de pastèque	Spectrométrie de masse
EO24	<i>Lactococcus lactis</i>	Eau d'olives fermentées	Spectrométrie de masse
LV120	<i>Lactococcus lactis</i>	Lait de vache	Spectrométrie de masse
L17	<i>Lactococcus lactis</i>	Ensilage	Génétique : ARN 16S
L3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Fromage : Munster	Génétique : ARN 16S

IV. Optimisation des conditions expérimentales pour la production des bactériocines

L'effet maximal (large zone d'inhibition) a été obtenu en absence de NaCl pour toutes les souches testées (**Figure 17**). Par contre, l'addition de l'extrait de levure a stimulé la production pour *Lactococcus lactis* L17 (à 2%) et pour *Enterococcus durans* LC2, *Enterococcus durans* JP1 et *Enterococcus durans* LV4 (à 3%) (**Figure 18**). A l'inverse, l'effet maximal pour *Lactococcus lactis* EO24, *Lactococcus lactis* LV120 et *Lactobacillus plantarum* L3 a été observé en absence d'extrait de levure (**Figure 17 ; Figure 18**).

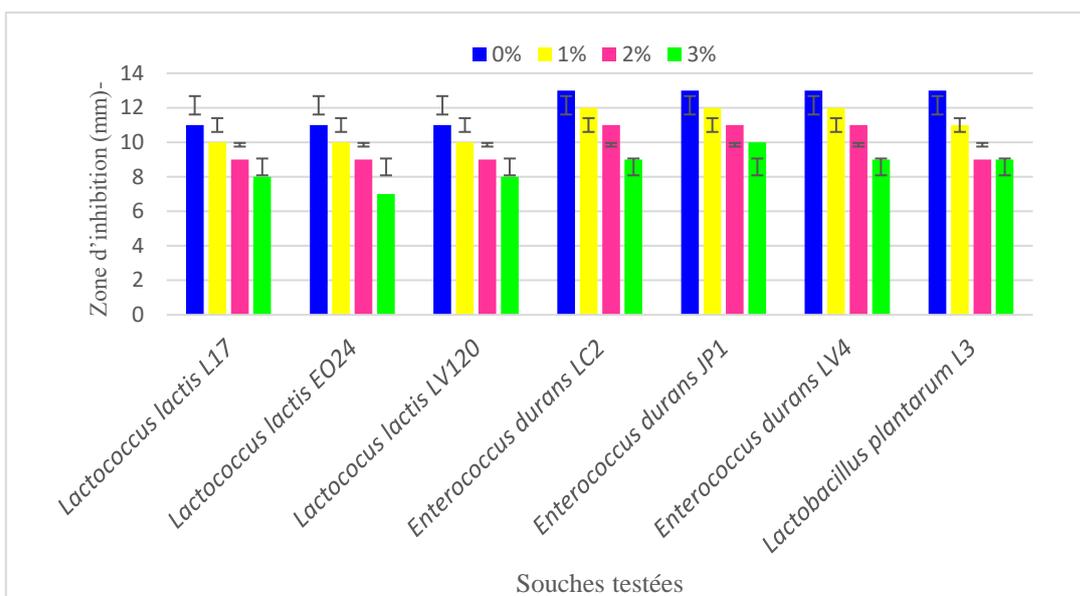


Figure 17. Effet de la concentration du NaCl sur l'activité antibactérienne

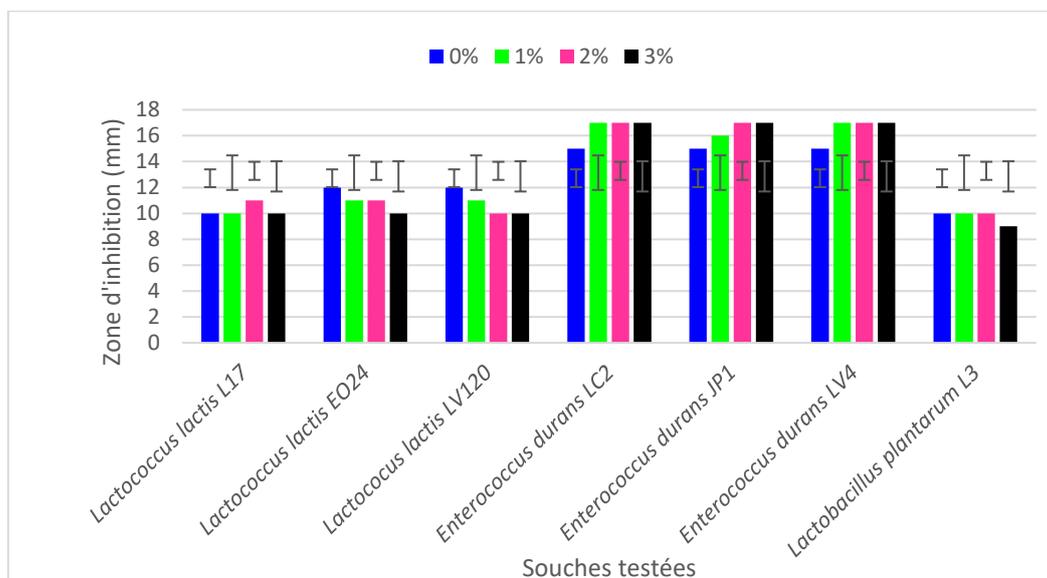


Figure 18. Effet de la concentration de l'extrait de levure sur sur l'activité antibactérienne

Par ailleurs, la température optimale était de 37° C pour toutes les souches testées avec un diamètre de zone d'inhibition qui varie de 10 à 13 mm (**Figure 19**). Les pH optimaux ont été de 7,0 pour *Lactobacillus plantarum* L3, de 7,5 pour *Lactococcus lactis* L17 et de 8,0 pour *Lactococcus lactis* EO24, *Lactococcus lactis* LV120, *Enterococcus durans* LC2, *Enterococcus durans* JP1 et *Enterococcus durans* LV4 avec un diamètre de zone d'inhibition variant de 12 à 16 mm (**Figure 20**). D'autre part, la cinétique de la croissance bactérienne a montré que la production maximale des bactériocines a été obtenue pendant de la phase exponentielle (entre 12h et 18h) (**Figure 21**).

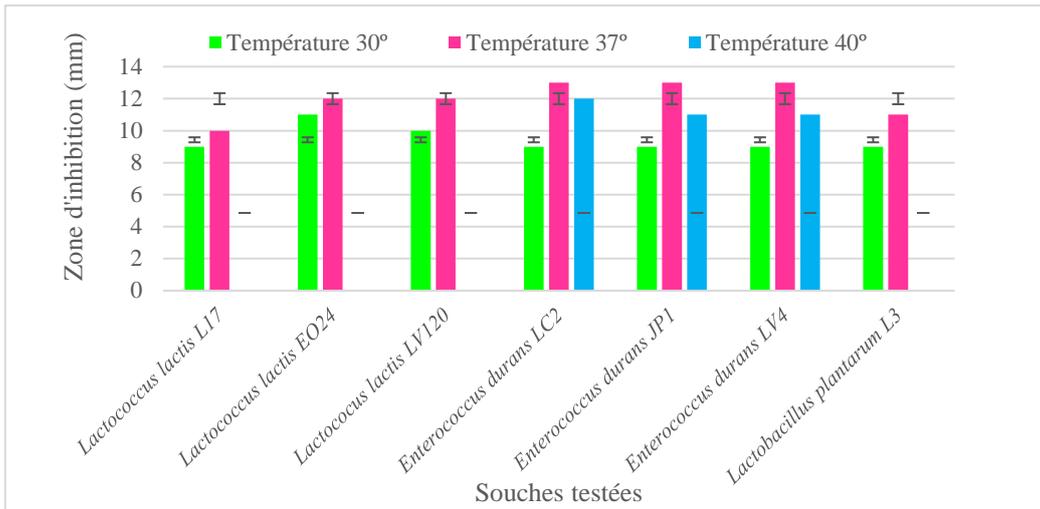


Figure 19. Effet de la température sur sur l'activité antibactérienne

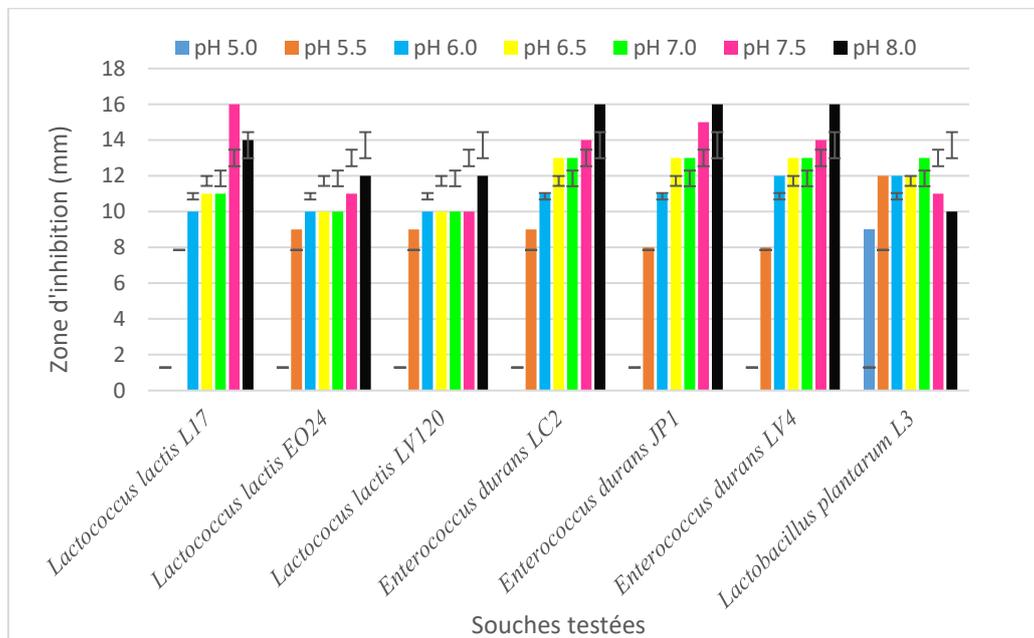


Figure 20. Effet du pH initial de culture sur l'activité antibactérienne

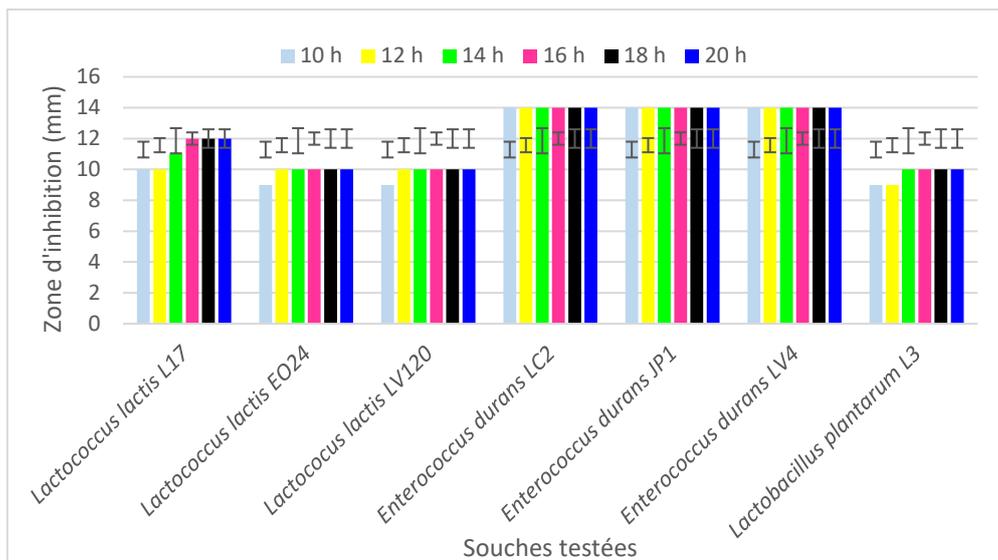


Figure 21. Cinétique de la production des bactériocines

Pour chaque extrait, l'activité a également été déterminée selon la méthode des dilutions critiques (chapitre II : Matériel et méthodes). L'effet de trois paramètres expérimentaux a été étudié : la température, le pH initial et la durée d'incubation. Les résultats obtenus confirment ceux basés sur la mesure du diamètre de zone d'inhibition (**Tableau 17**). En effet, l'activité maximale pour toutes les souches a été obtenue à 37°C. Le pH initial optimal a été de 7,0 pour *Lactobacillus plantarum* L3, de 7,5 pour *Lactococcus lactis* L17 et de 8,0 pour *Lactococcus lactis* EO24, *Lactococcus lactis* LV120, *Enterococcus durans* LC2, *Enterococcus durans* JP1 et *Enterococcus durans* LV4 avec une activité qui varie de 200 à 12800 UA/ml. Pour toutes les souches testées, la durée d'incubation optimale se situe entre 16 h et 18 h.

Tableau 17. Effet de différentes conditions expérimentales sur l'activité antibactérienne mesurée dans l'extrait de culture des souches sélectionnées exprimée en UA/ml

	Durée d'incubation (h)				Température (°C)			pH initial de culture					
	12	16	18	20	30°	37°	40°	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
<i>Lactococcus lactis</i> L17	200	400	400	400	400	800	0	0	400	400	1600	6400	800
<i>Lactococcus lactis</i> EO24	400	400	400	400	400	800	0	0	100	800	800	1600	3200
<i>Lactococcus lactis</i> LV120	400	400	400	400	400	800	0	0	100	400	800	1600	3200
<i>Enterococcus durans</i> LC2	1600	1600	1600	800	400	6400	3200	200	200	400	6400	6400	12800
<i>Enterococcus durans</i> JP1	1600	1600	1600	800	400	6400	3200	200	200	800	6400	6400	12800
<i>Enterococcus durans</i> LV4	1600	1600	1600	800	200	6400	3200	200	200	400	6400	6400	12800
<i>Lactobacillus plantarum</i> L3	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	200	100	100

V. Purification des bactériocines

L'optimisation du protocole de purification des bactériocines était basée essentiellement sur l'utilisation d'une nouvelle colonne phényl hexyl comme cela a été décrit dans la section matériel et méthodes. Cette optimisation a été utilisée pour l'ensemble des bactériocines produites par les sept souches retenues.

1. Bactériocines des entérocoques

Les trois souches d'*Enterococcus durans* LV4, JP1 et LC2 retenues pour cette étude ont été isolées à partir du lait de vache, de jus de pastèque et du lait de chamelle respectivement. Elles ont toutes montré un profil identique en termes d'identification par spectrométrie de masse et de bactériocines produites. C'est pour cette raison, que nous allons présenter uniquement les résultats de la purification des bactériocines de la souche *Enterococcus durans* LC2. D'après le spectre d'activité réalisé pour cette souche, c'est *Enterococcus raffinosus* E26 qui a été retenue comme souche indicatrice pour les différentes étapes de purification.

Lors de la première étape de purification (passage direct sur colonne échangeuse de cations à pH 6,5), nous avons analysé l'activité antibactérienne de toutes les fractions obtenues, à savoir : l'extrait de culture (Fraction I), le filtrat et l'éluat (Fraction II) (**Tableau 18**) afin de récupérer la totalité de l'activité produite (des fractions actives) par la souche d'*Enterococcus durans* LC2.

Tableau 18. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture d'*Enterococcus durans* LC2

Fractions	Activité antibactérienne UA/ml*
Extrait de culture (Fraction I)	12800
Filtrat	400
Eluat (Fraction II)	25600

*Activité en unités arbitraires par ml mesurée sur *Enterococcus raffinosus* E26 comme souche indicatrice.

La fraction II a été passée en HPLC sur une colonne semi-préparative en phase inverse C8. Le profil chromatographique a montré trois fractions actives avec une activité antibactérienne notable. Ces fractions correspondaient à trois pics avec des temps de rétention de 8 min, 13,9 min et de 14,5 min respectivement (**Figure 22**). Chacune des trois fractions a été passée sur la colonne analytique en phase inverse C18. Les fractions centrales montrant les

plus larges zones d'inhibitions ont par la suite été passées sur la colonne analytique en phase inverse phényl hexyl.

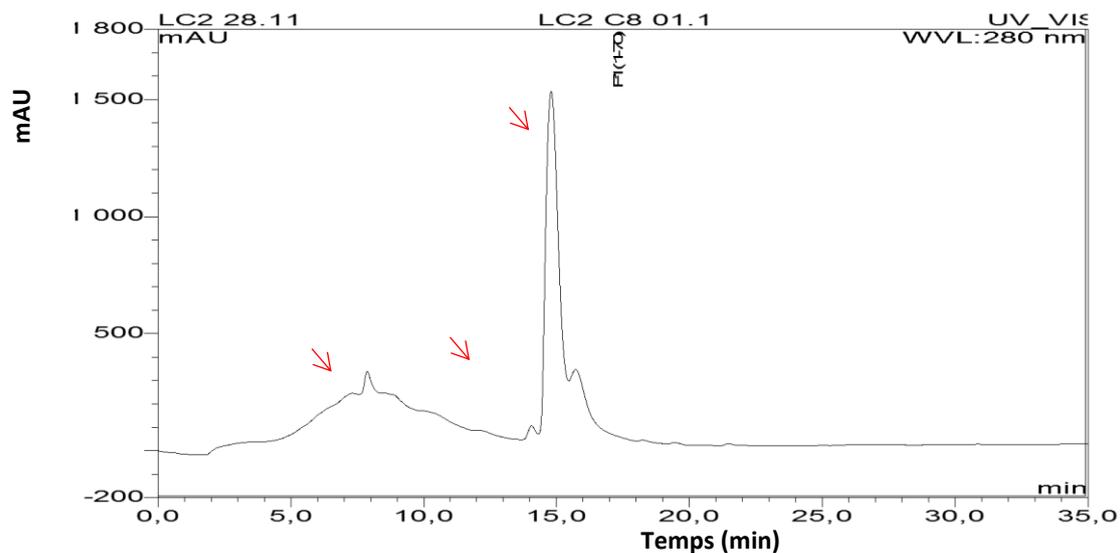


Figure 22. Profil chromatographique de la fraction II après passage en HPLC sur une colonne semi-préparative en phase inverse C8. Détection en UV à 280 nm. Les flèches en rouge indiquent les fractions centrales actives

Après deux passages successifs des fractions centrales actives sur cette colonne phényl hexyl, cinq fractions actives ont été isolées correspondant à des pics à différents temps de rétention : fraction A à 8 min (gradient B) ; fraction B1 à 5,5 min, fraction B2 à 6,0 min ; fraction C1 à 6,8 min et fraction C2 à 7,5 min (gradient A) (**Figure 23**).

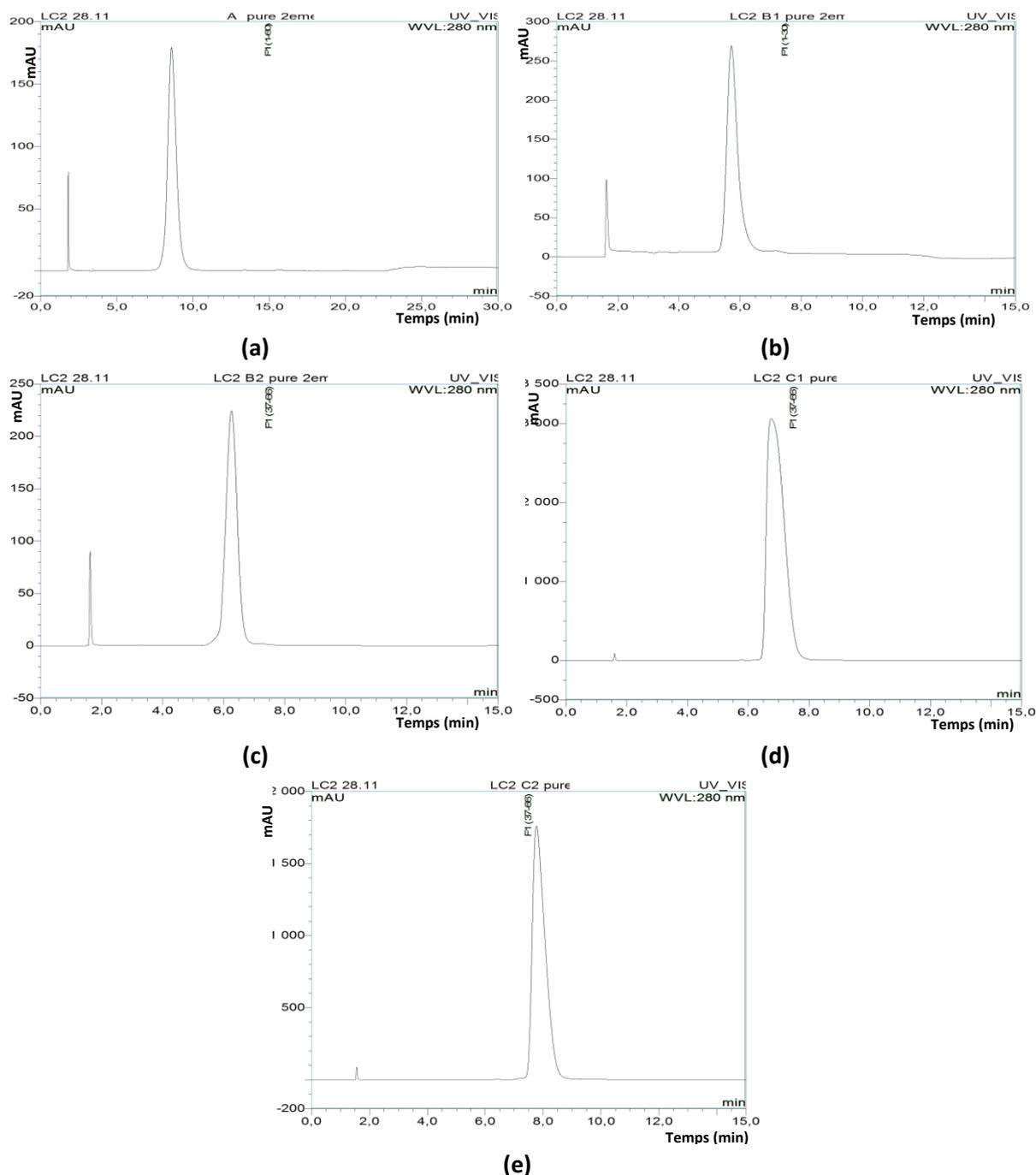
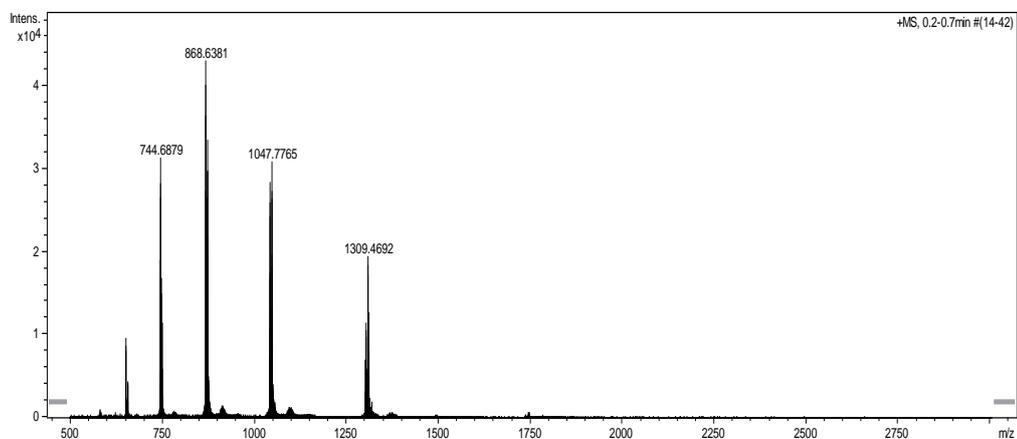


Figure 23. Profils chromatographiques des fractions purifiées après passage en HPLC sur une colonne analytique phényl hexyl avec détection en UV à 280 nm à partir de l'extrait de culture d'*Enterococcus durans* LC2 : (a) fraction A obtenue après élution par le gradient B (b) fraction B1 (c) fraction B2 (d) fraction C1 et (e) fraction C2, obtenues après élution par le gradient A

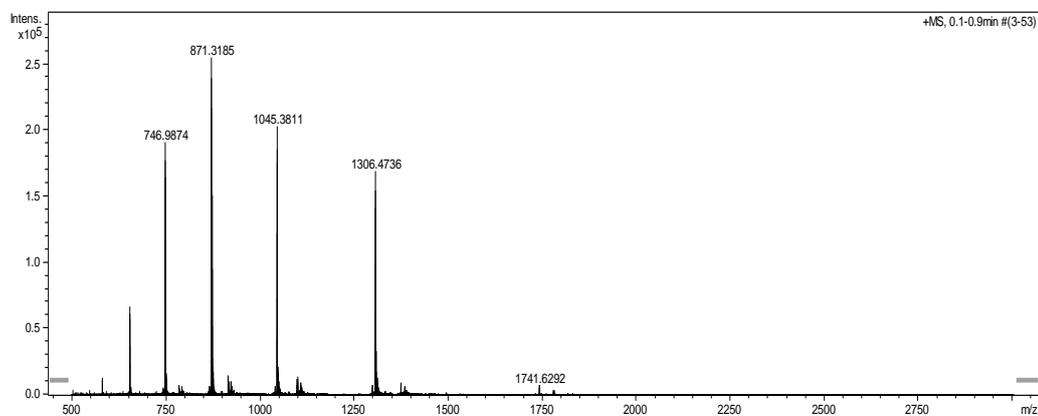
La purification des peptides produits par la souche *Enterococcus durans* LC2 était relativement aisée pour les peptides B1, B2, C1 et C2, ce qui a permis de les isoler et de déterminer leurs masses moléculaires par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF. Celles-ci sont respectivement de 5231,82 Da ; 5219,85 Da ; 4471,44 Da et 4460,94 Da. Cependant, la

purification du peptide A s'est avérée plus difficile du fait de l'interférence de certaines impuretés au niveau de la séparation chromatographique sur phase inverse. Son identification par SM n'a donc pas pu être faite (**Figure 24**).



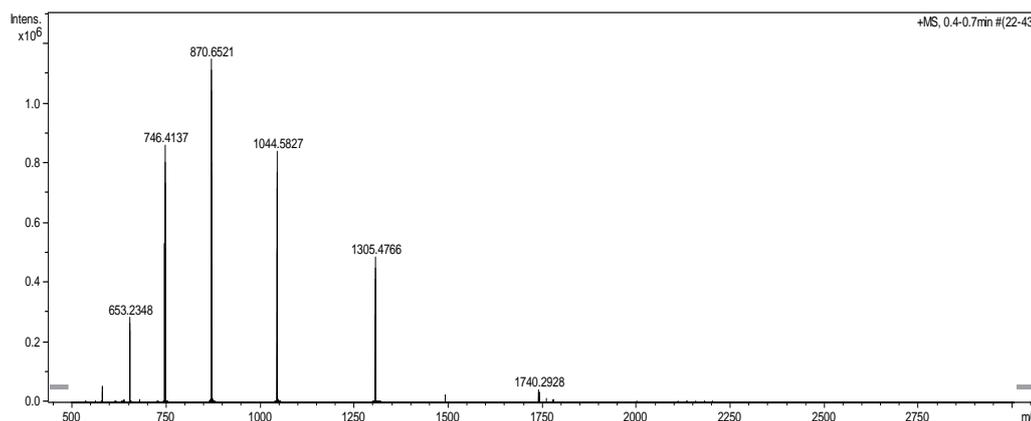
B1

Component	Mass	Molecule	Abundance	Abund. [%]	StdDeviation
A	5231.8276	[M + H] ⁺	100939	100	0.061505
B	5215.8160	[M + H] ⁺	40860	40	0.060465
C	3253.7821	[M + H] ⁺	10110	10	0.177791
D	5203.7813	[M + H] ⁺	15186	15	0.049063
E	4461.5717	[M + H] ⁺	5830	6	0.278681



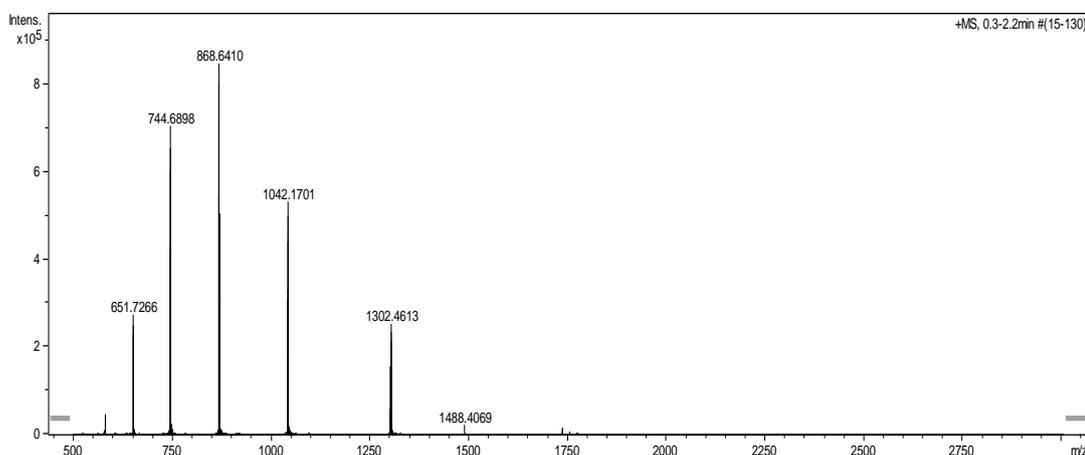
B2

Component	Mass	Molecule	Abundance	Abund. [%]	StdDeviation
A	5219.8564	[M + H] ⁺	902077	100	0.063365



C1

Component	Mass	Molecule	Abundance	Abund. [%]	StdDeviation
A	4471.4472	[M + H] ⁺	861579	100	0.247883
B	3913.0440	[M + H] ⁺	285327	33	0.204101
C	5215.8720	[M + H] ⁺	308167	36	0.034584



C2

Component	Mass	Molecule	Abundance	Abund. [%]	StdDeviation
A	4460.9498	[M + H] ⁺	705896	100	0.312324
B	3253.6115	[M + H] ⁺	274799	39	0.225555
C	5203.8096	[M + H] ⁺	187433	27	0.034119

Figure 24. Spectres des masses réalisés par ESI-MS des fractions collectées (B1, B2, C1 et C2) après séparation par HPLC

La comparaison des masses des peptides purifiés avec les données de la littérature a montré que les deux peptides B1 et B2 correspondaient aux entérocinés L50A et L50B, avec néanmoins une différence de masse de 41,45 et 41,57 Da respectivement. En effet, les masses rapportées pour les entérocinés L50A et L50B sont de 5190,37 Da et 5178,28 Da respectivement (Cintas *et al.*, 1998). Les masses des peptides C1 et C2, quant-à elles ne correspondaient à aucune masse répertoriée dans la littérature ; 4471,44 Da et 4460,94 Da

L'analyse des résultats a montré que la séquence du peptide C2 contenait 40 acides aminés avec une identification incertaine pour cinq acides aminés situés vers la fin de la chaîne peptidique obtenue (**Tableau 19**). En considérant la masse et la séquence peptidique obtenues, le peptide C2 peut être considéré un fragment actif de l'entéroccine L50B. Concernant le peptide C1, le séquençage a été bloqué au bout d'une douzaine d'acides aminés N-terminaux dont la séquence est identique à celle de l'entéroccine L50A. Il peut s'agir là aussi d'un fragment actif de l'entéroccine L50A (**Tableau 19**).

Par conséquent, aussi bien pour B2, C1 et C2 un nouveau séquençage génétique s'avère nécessaire.

Tableau 19. Comparaison des séquences peptidiques obtenues par la dégradation d'Edman et par traduction des séquences nucléotidiques des bactériocines purifiées à partir de la souche *Enterococcus durans* LC2 par rapport aux entéroccines L50A et L50B natives

	Séquences traduites des gènes L50A et L50B séquencés chez LC2	Nombre d'aa	Masse calculée (Da)	Masse mesurée (Da)
L50A (données de littérature)	MGAI AKLV A KFGWPI V KK Y YKQIMQFIG E GW A INKI E W I KK H I	44	5190,37	-
B1 (obtenue par séquençage de l'ADN)	MGAI AKLV A KFGWPI V KK Y YKQIMQFIG E GW A INKI E W I KK H I	44	5190.37	5231,82
C1 (obtenue par dégradation d'Edman)	MGAI AKLV A KFG.....	12	1205.52	4471,44
L50B (données de littérature)	MGAI AKLV T KFGWPL I KK F YKQIMQFIG Q GW T IDQ I EK W LKR H	43	5178.28	-
B2 (obtenue par séquençage de l'ADN)	MGAI AKLV T KFGWPL I KK F YKQIMQFIG Q GW T IDQ N EK W LKR H	43	5179.22	5219,85
C2 (obtenue par dégradation d'Edman)	MGAI AKLV T KFGWPL I KK F YKQIMQFIG Q GW T IDQ I EK W L	40	4756,78	4460,94

Les acides aminés en mauve et en jaune montrent la différence de la composition peptidique entre L50A et L50B.

L'asparagine 36 (N) représente la seule différence observée entre B2 et l'entéroccine L50B (bleu clair). L'identification des acides aminés en rouge est incertaine.

2. Bactériocines des lactocoques

a. *Lactococcus lactis* EO24 et LV120

Les deux souches de *Lactococcus lactis* **EO24** et **LV120** ont été isolées à partir de la saumure d'olives fermentés et du lait de vache respectivement. Les résultats obtenus en termes d'identification par spectrométrie de masse et de production de bactériocines nous ont amenés à présenter uniquement les résultats de purification des bactériocines de la souche *Lactococcus lactis* **EO24**. La purification des peptides produits par cette souche a posé quelques difficultés. Le protocole de purification a dû être modifié en incluant une étape de précipitation au sulfate

d'ammonium afin de pouvoir purifier les différents peptides. Cette étape permet de concentrer les bactériocines et de réduire le volume de l'extrait de culture actif. En effet, c'est une technique classique utilisée lors de la purification des protéines, elle consiste à mettre en contact l'extrait de culture centrifugé avec 440 g.L⁻¹ de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ (Fluka, Steinheim, Pays-Bas) et 0,1% de tween 80 (Fluka), puis à laisser agir pendant une nuit à 0°C. Après une centrifugation à 10000 tr/min pendant une heure, le précipité est ensuite solubilisé dans une solution d'acétate de sodium 20 mM (V/2V). La solution obtenue est la Fraction I que nous avons passée directement sur l'échangeur de cations après ajustement de son pH à 6,5. Mis-à-part cette étape de concentration des bactériocines par l'addition du sulfate d'ammonium, la suite du protocole de la purification des bactériocines a été effectuée selon les étapes décrites dans la section matériel et méthodes. D'après le spectre d'activité réalisé pour *Lactococcus lactis* EO24, nous avons utilisé l'isolat LV132, non identifié, comme souche indicatrice pour les différentes étapes de purification.

Lors du passage de la Fraction I sur la colonne échangeuse de cations à pH 6,5, nous avons analysé l'activité antibactérienne de toutes les fractions obtenues, à savoir : l'extrait de culture avant précipitation (E1), surnageant (S), extrait de culture après précipitation (Fraction I), le filtrat (F) et l'éluat (Fraction II) (**Tableau 20**) afin de récupérer la totalité de l'activité produite par *Lactococcus lactis* EO24.

Tableau 20. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture de *Lactococcus lactis* EO24

Fractions	Activité antibactérienne UA/ml*
Extrait de culture avant précipitation (E1)	6400
Surnageant (S)	0
Extrait de culture après précipitation (Fraction I)	3200
Filtrat (F)	200
Eluat (Fraction II)	12800

*Activité en unités arbitraires par ml mesurée sur l'isolat LV132 comme souche indicatrice.

La fraction II a été passée sur une colonne semi-préparative en phase inverse C8. Le profil chromatographique a montré trois zones d'activité notable : une première majeure correspondant aux fractions 17 à 20 avec des diamètres de zones d'inhibition compris entre 19 et 22 mm ; une deuxième correspondant aux fractions 22 à 24 avec des diamètres de zones d'inhibition compris entre 20 et 25 mm ; et une troisième correspondant aux fractions 32 à 34 avec des diamètres de zones d'inhibition de 18 et 21 mm (**Figure 27**). Les fractions

correspondant à chaque zone d'activité ont été regroupées et passées sur les colonnes analytiques C18 puis phényl hexyl (**Figure 28**).

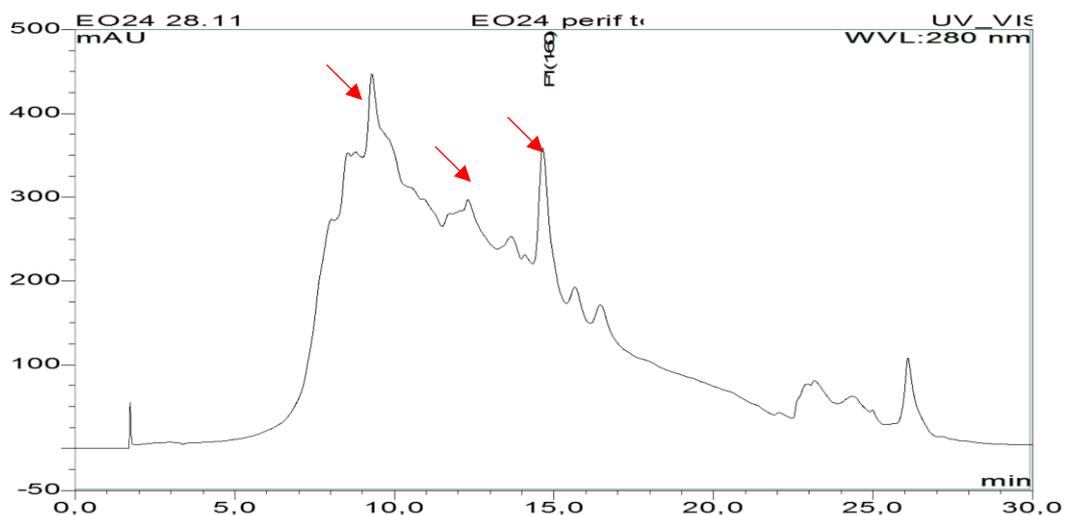
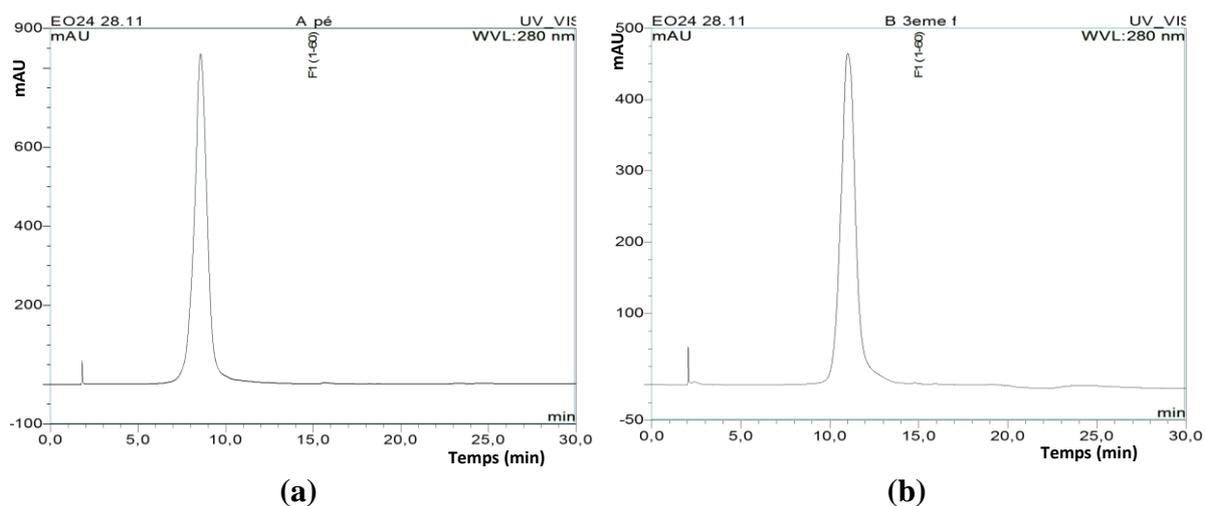
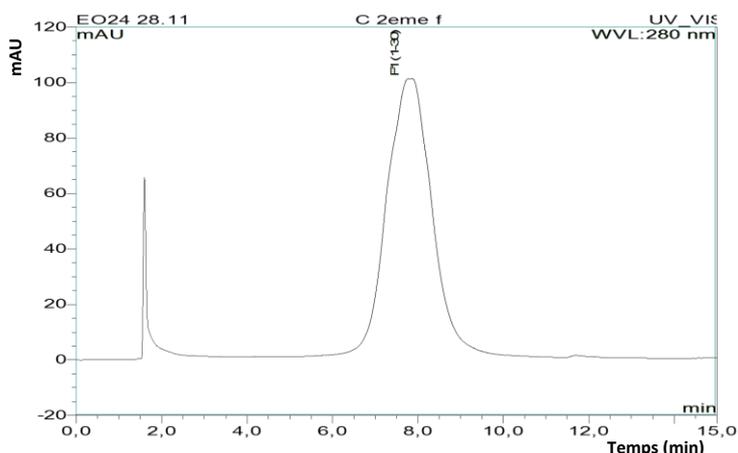


Figure 27. Profil chromatographique de la fraction II après passage sur une colonne semi-préparative en phase inverse C8 avec détection en UV à 280 nm. Les flèches en rouge indiquent les fractions centrales actives

Le test de l'activité antibactérienne des fractions collectées toutes les 30 secondes après séparation sur la colonne phényl hexyl, a montré que le maximum de l'activité se situait au niveau des fractions correspondant aux pics chromatographiques à 8,5 min (gradient B) (**Figure 28a**) ; à 10,5 min (gradient B) (**Figure 28b**) et à 7,3 min (gradient A) (**Figure 28c**).

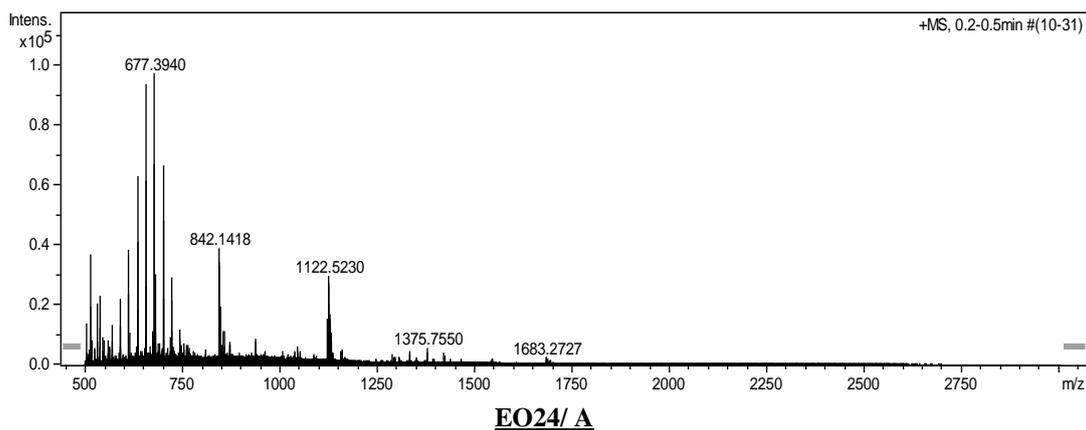




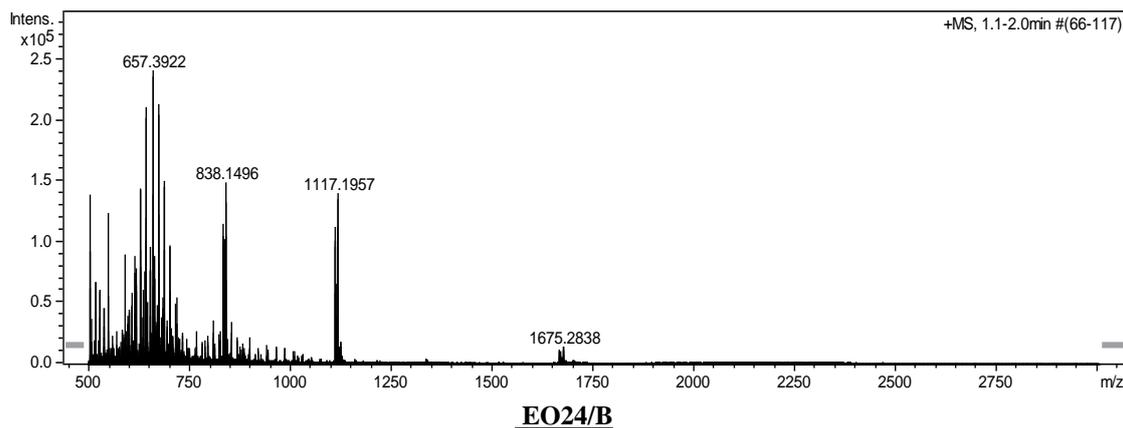
(c)

Figure 28. Profils chromatographiques des trois bactériocines produites par *Lactococcus lactis* EO24 purifiées après passage sur la colonne phényl hexyl en HPLC phase inverse à 280 nm. (a) fraction A, (b) fraction B obtenues après élution par le gradient B et (c) fraction C, obtenue après élution par le gradient A

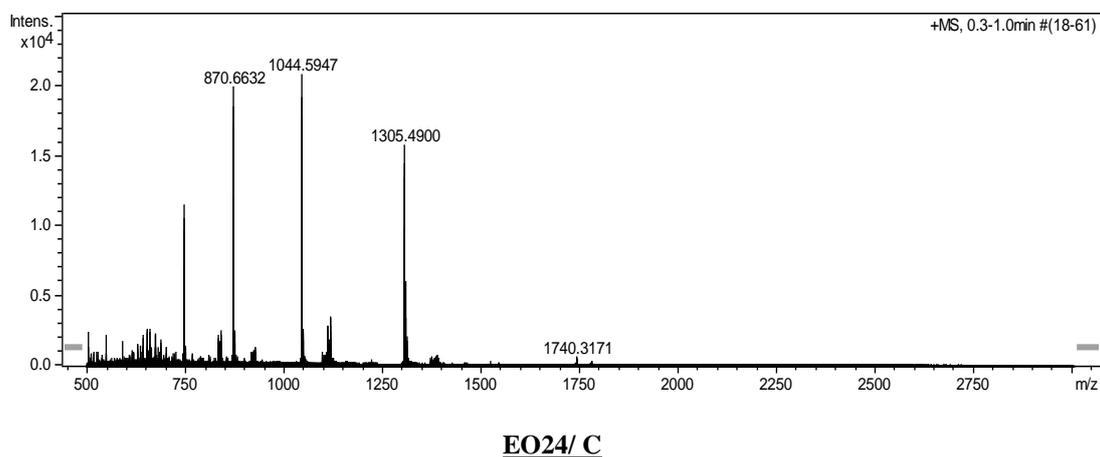
La purification des peptides produits par *Lactococcus lactis* EO24 a permis d’isoler trois fractions contenant des peptides actifs A, B et C. Les spectres de masse obtenus ont toutefois montré que les fractions contenant les peptides A et B n’étaient pas suffisamment pure pour pouvoir déterminer les masses de ces peptides (**Figure 29**). Leur identification par SM n’a donc pas pu être faite. Par contre, la masse moléculaire de la fraction C a pu être déterminée ; elle est de 5214,90 Da (**Figure 29**), mais elle ne correspond à aucune masse répertoriée dans la littérature. Le séquençage peptidique de cette fraction est toujours en cours.



Component	Mass	Molecule	Abundance	Abund.[%]	StdDeviation
A	1353,779	[M + H] ⁺	90406	100	0,067826
B	1309,7526	[M + H] ⁺	86935	96	0,06493
C	1397,8023	[M + H] ⁺	61464	68	0,073538
D	1265,7245	[M + H] ⁺	59799	66	0,059745



Component	Mass	Molécule	Abundance	Abund. [%]	StdDeviation
A	1970,1601	[M + H] ⁺	253444	73	0,020547
B	2014,1992	[M + H] ⁺	285787	82	0,056803
C	1926,1334	[M + H] ⁺	222691	64	0,041488
D	2058,2101	[M + H] ⁺	224514	64	0,049088



Component	Mass	Molécule	Abundance	Abund. [%]	StdDeviation
A	5215,9258	[M + H] ⁺	71486	100	0,046442
B	3345,5438	[M + H] ⁺	6916	10	0,076291
C	3330,5521	[M + H] ⁺	5827	8	0,09262
D	5231,9209	[M + H] ⁺	8876	12	0,046977

Figure 29. Spectres de masse réalisés par ESI-Q-TOF des fractions collectées (A, B et C) après séparation par HPLC

b. *Lactococcus lactis* L17

La souche *Lactococcus lactis* L17, préalablement étudiée, produit de la nisine Z. La purification de cette bactériocine a été effectuée selon les étapes décrites auparavant. D'après son spectre d'activité, c'est la souche *Enterococcus raffinosus* E26 qui a été utilisée comme souche indicatrice au cours des différentes étapes de purification (**Tableau 21**).

Tableau 21. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture de *Lactococcus lactis* L17

Fractions	Activité antibactérienne UA/ml*
Extrait de culture (Fraction I)	6400
Filtrat	400
Eluat (Fraction II)	12800

*Activité en unités arbitraires par ml mesurée sur l'*Enterococcus raffinosus* E26 comme souche indicatrice.

Après injection de la Fraction II sur la colonne C8 semi-préparative, les fractions éluées ont été collectées (70 fractions) puis testées par la technique du « *spot on the lawn* » comme décrit précédemment. Seules les fractions 30 et 31, correspondant au même pic chromatographique ont montré une activité avec des diamètres de zone d'inhibition de 27 et 29 mm. Ces deux fractions ont été réunies puis repassées sur la colonne phényl hexyl directement. La fraction active obtenue correspond à un pic bien isolé à 7,0 min (gradient A) (**Figure 30**).

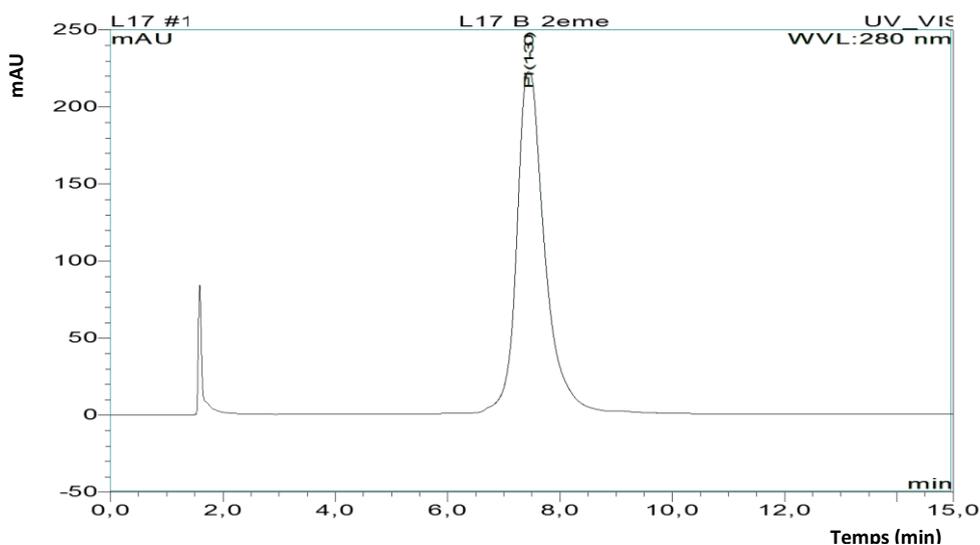


Figure 30. Profil chromatographique de la fraction active obtenue après élution par le gradient A produite par *Lactococcus lactis* L17 après passage sur la colonne phényl hexyl en HPLC phase inverse avec détection en UV à 280 nm

La fraction a été analysée par la suite par ESI Q-TOF. La masse obtenue correspond bien à celle de la nisine Z : 3330,04 Da, avec une abondance de 100%.

3. Bactériocines des lactobacilles

La souche *Lactobacillus plantarum* L3 préalablement étudiée, produit de la pédiocine PA-1. Son extrait de culture a été soumis au même protocole de purification que celui décrit précédemment. La souche *Enterococcus raffinosus* E26 a été utilisée comme souche indicatrice pour les différentes étapes de purification. L'activité antibactérienne des fractions obtenues a été testée après passage direct de l'extrait de culture sur la colonne échangeuse de cations à pH 6,5 (**Tableau 22**). La fraction II a ensuite été passée sur la colonne C8 semi-préparative.

Tableau 22. Activité antibactérienne des fractions testées lors de la chromatographie d'échange de cations de l'extrait de culture de *Lactobacillus plantarum* L3

Fractions	Activité antibactérienne UA/ml*
Extrait de culture (Fraction I)	3200
Filtrat	200
Eluat (Fraction II)	6400

*Activité en unités arbitraires par ml mesurée sur l'*Enterococcus raffinosus* E26 comme souche indicatrice.

Le chromatogramme obtenu après injection de la fraction II sur la colonne C8, montre un seul pic qui coïncide avec l'activité maximale de l'échantillon injecté. Les fractions actives réunies ont été passées sur la colonne phényl hexyl directement. La fraction active obtenue correspond à un pic bien isolé comme le montre la **figure 31**. Ce pic a été obtenu à un temps de rétention de 8,7 min (gradient B).

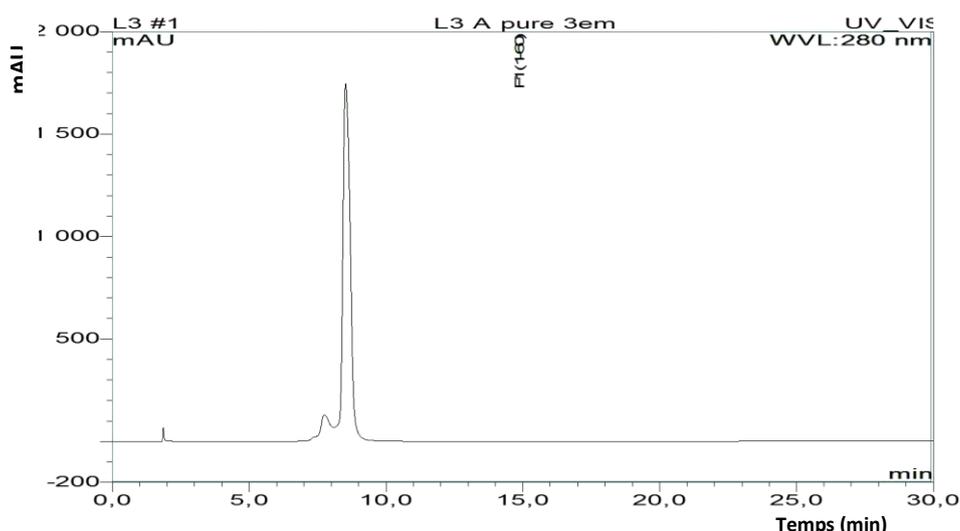
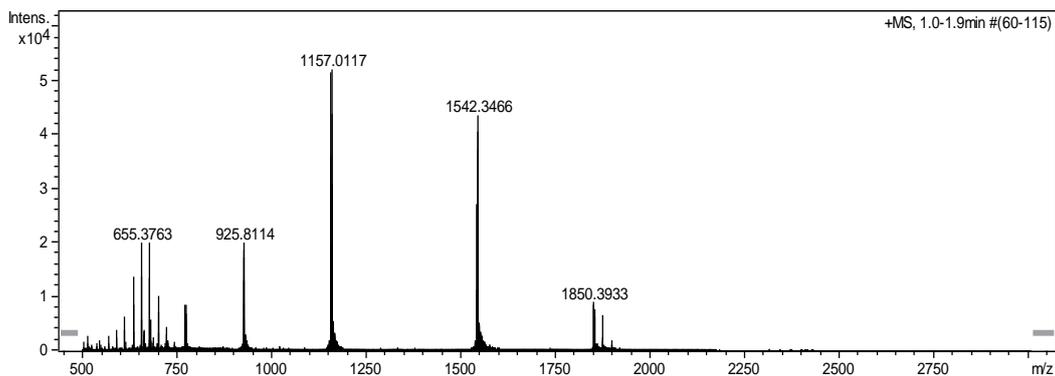


Figure 31. Profil chromatographique de la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* L3 purifiée sur la colonne phényl hexyl en HPLC phase inverse obtenue après élution par le gradient B. Détection en UV à 280 nm

La mesure de la masse du peptide purifié par ESI Q-TOF a montré que celle-ci correspondait bien à celle de la pédiocine PA-1 : 4622,01 Da (**Figure 32**).



Pédiocine PA-1

Component	Mass	Molecule	Abundance	Abund. [%]	StdDeviation
A	4622,015	[M + H] ⁺	128438	100	0,063339
B	1309,7439	[M + H] ⁺	20060	16	0,025985

Figure 32. Spectre de masse réalisé par ESI Q-TOF de la fraction collectée après séparation par HPLC

VI. Analyse structurale des bactériocines

Au total, nous avons purifié sept bactériocines produites par quatre souches différentes, à savoir : la souche *Enterococcus durans* LC2 productrice de deux formes modifiées des entérocinés L50A et L50B (B1, B2, C1 et C2), la souche *Lactococcus lactis* EO24 productrice d'une bactériocine non encore identifiée (EO24/C), la souche *Lactobacillus plantarum* L3 productrice de la pédiocine PA-1 et enfin la souche *Lactococcus lactis* L17 productrice de la nisine Z. Pour la suite des expériences, de la nisine commerciale (A) a également été utilisée (**Tableau 23**).

Tableau 23. Comparaison des masses moléculaires de l'ensemble des bactériocines purifiées dans cette étude

Souches productrices	Peptides	MM (Da)	Nombre d'aa	Bactériocine	Différence de masse par rapport à la littérature
<i>E. durans</i> LC2	LC2 /A	--	--	NP	--
	LC2 /B1	5231,82	43	Entérocoque L50A	+ 41,59 Da
	LC2 /B2	5219,85	44	Entérocoque L50B	+41,47 Da
	LC2 /C1	4471,44	12	Entérocoque L50A	-718, 91 Da
	LC2 /C2	4460,94	40	Entérocoque L50B	-717,32 Da
<i>L. lactis</i> EO24	EO24/A	--	--	NP	--
	EO24/B	--	--	NP	--
	EO24/C	5214,92	--	NI	NI
<i>L. lactis</i> L17	L17/A	5215,88	34	Nisine Z	Pas de modification
<i>L. plantarum</i> L3	L3/A	4622,01	44	Pédiocine PA-1	Pas de modification

NP : Non Purifié ; NI : Non Identifié

VII. Activité antibactérienne des peptides B1 et B2 sur des pathogènes alimentaires (CMI en $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

L'activité antibactérienne des bactériocines purifiées B1 (entérocoque L50A) et B2 (entérocoque L50B) seules et en combinaison vis-à-vis d'une large gamme de bactéries pathogènes d'origine alimentaire est représentée au **tableau 24**. Les valeurs de CMI observées pour l'entérocoque L50A contre les souches sensibles sont très variables allant de $15,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* S5 à $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ vis-à-vis de *Staphylococcus epidermidis* S7. Des valeurs intermédiaires sont par exemple observées contre *Listeria monocytogenes* 3a L36 ($250 \mu\text{g.ml}^{-1}$), *Escherichia coli* E29 et *Staphylococcus xylosum* S8 ($62,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$) ou encore *Listeria innocua* L30 ($31,2 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Il est à noter qu'aucune activité antimicrobienne n'a été détectée vis-à-vis de *Salmonella enteritidis* S1 même à une concentration de $2000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et ceci aussi bien pour l'entérocoque L50A (B1) et l'entérocoque L50B (B2) (**Tableau 24**).

A cette même concentration, la bactériocine L50B (peptide B2) n'a pas montré d'activité vis-à-vis des quatre souches cibles : *Enterococcus casseliflavus* E1, *Enterococcus columbae* E2, *Enterococcus faecalis* E3 et *Salmonella enteritidis* S1. Globalement, cette bactériocine a montré une activité plus faible par rapport à celle de l'entérocoque L50A (peptide B1). En effet, sa CMI varie de $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour *Enterococcus faecium* E10, *Escherichia coli* E29, *Staphylococcus epidermidis* S7, *Staphylococcus xylosum* S8 et *Listeria monocytogenes* 3b L37 à $31,25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ vis-à-vis de *Listeria innocua* L30.

La combinaison des deux entérocoques L50A et L50B (peptide B1+B2) a montré une activité synergique très significative. Ainsi, pour la majorité des souches cibles, la CMI enregistrée a atteint la valeur de 15,65 µg.ml⁻¹, sauf pour *Staphylococcus aureus* S5 où aucun effet synergique n'a été détecté.

Tableau 24. Concentrations minimales inhibitrices des deux entérocoques L50A (B1) et L50B (B2) vis-à-vis de souches indicatrices pathogènes d'origine alimentaire

Souches indicatrices	CMI en µg.ml ⁻¹		
	L50A (B1)	L50B (B2)	L50 A+B (B1+B2)
<i>Enterococcus casseliflavus</i> E1	125	>2000	15,65
<i>Enterococcus columbae</i> E2	500	>2000	62,5
<i>Enterococcus faecalis</i> E3	125	>2000	31,25
<i>Eenterococcus faecium</i> E4	125	250	15,65
<i>Eenterococcus faecium</i> E10	62,5	1000	15,65
<i>Eenterococcus faecium</i> E11	31,3	500	15,65
<i>Escherichia coli</i> E29	62,5	1000	15,65
<i>Salmonella enteritidis</i> S1	>2000	>2000	>2000
<i>Staphylococcus aureus</i> S5	15,65	500	15,65
<i>Staphylococcus epidermidis</i> S7	500	1000	250
<i>Staphylococcus xylosus</i> S8	62,5	1000	15,65
<i>Listeria innocua</i> L30	31,3	31,25	15,65
<i>Listeria innocua</i> L31	31,3	250	15,65
<i>Listeria monocytogenes 3a</i> L36	250	500	15,65
<i>Listeria monocytogenes 3b</i> L37	62,5	1000	15,65
<i>Bacillus cereus</i> B1	62,5	250	15,65

VIII. Activité antibactérienne des bactériocines purifiées vis-à-vis des pathogènes humains

1. Collecte et identification de bactéries pathogènes d'origine humaine multi-résistantes aux antibiotiques

L'isolement de bactéries multi-résistantes a été effectué à partir de 1143 échantillons cliniques récoltés, parmi lesquels 244 présentant une infection (**Tableau 25**). L'antibiogramme a révélé que 167 échantillons sur les 244 testés étaient multi-résistants, soit une prévalence de 68,4% (**Figure 33**). Les bactéries multi-résistantes ont été isolées majoritairement à partir des urines (72%), mais également à partir du pus (18%), ainsi qu'à partir d'autres liquides biologiques tels que le crachat, les selles et le sang (**Figure 34**).

Tableau 25. Résultats de l'échantillonnage des isolats cliniques

Nature de prélèvement	Nombre d'échantillon	Résultat d'analyse		
		Négatif	Positif	
			Résistant	Sensible
ECBU	792	616	132	44
Coproculture	176	171	2	3
Crachat	57	51	2	4
Hémoculture	9	7	2	0
Pus	88	44	20	24
PDP	9	6	2	1
Sonde urinaire	5	0	5	0
Prélèvement conjonctival	7	4	2	1

ECBU : Examen CytoBactériologique des Urines, PDP : Prélèvement Distal Protégé.

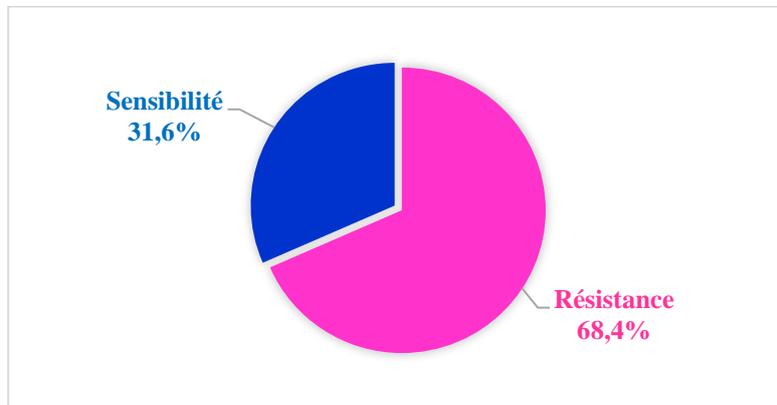


Figure 33. Taux de la résistance de l'ensemble des espèces retenues

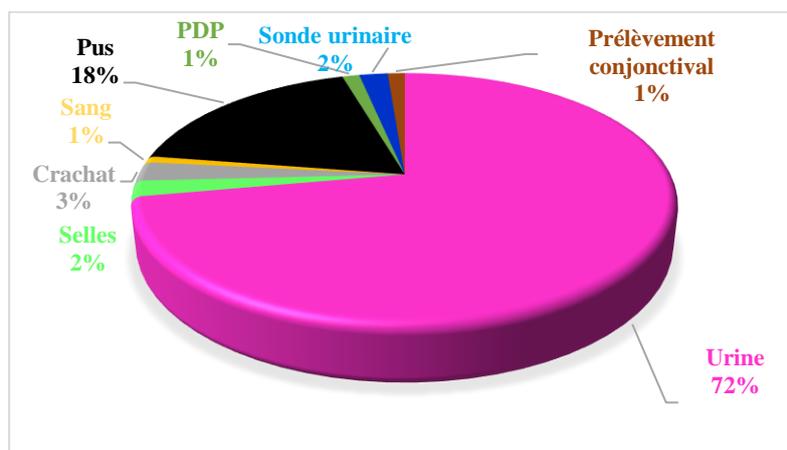


Figure 34. Répartition des BMRe en fonction de l'origine de l'échantillon biologique

Les 167 souches multi-résistantes ont été identifiées comme appartenant à différentes espèces : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*. La **figure 35** montre l'aspect de quelques colonies identifiées après croissance sur milieu sélectif.

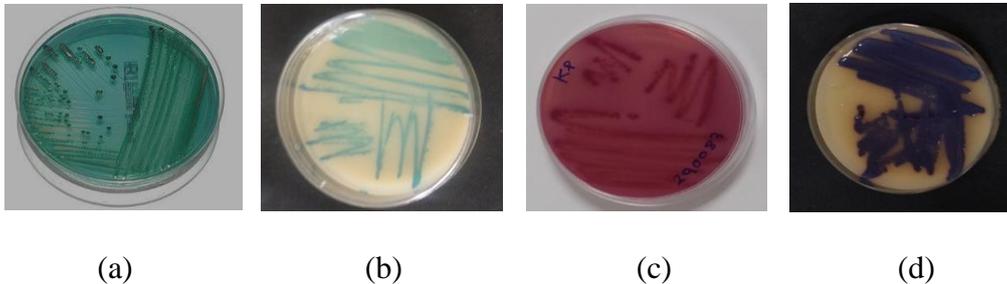


Figure 35. Identification des germes isolés en fonction de la couleur des colonies obtenues sur milieu sélectif. (a) colonies de *Salmonella spp* sur milieu Hektoene. (b) colonies d'*Enterococcus faecalis* sur milieu Brilliance. Colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu Chapman (c) et sur milieu Brilliance (d)

En se basant sur le profil de résistance et la pathogénicité des différentes espèces identifiées, 30 souches de bactéries multi-résistantes ont été retenues pour la suite du travail. Le **tableau 26** montre la répartition des BMRe sélectionnées en fonction de la nature du prélèvement, de la tranche d'âge et du sexe du patient.

Tableau 26. Répartition des BMRe retenues en fonction de la nature du prélèvement, de l'âge et du sexe de patient

Référence	Germe isolé	Nature du prélèvement	Age	Sexe
290083	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ECBU	68 ans	Homme
290146	<i>Salmonella spp</i>	Coproculture	59 ans	Homme
240001	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Hémoculture	59 ans	Homme
300043	<i>Enterococcus faecalis</i>	ECBU	69ans	Homme
250095	<i>Enterococcus faecalis</i>	ECBU	77 ans	Homme
60125	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crachat	58 ans	Femme
230173	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ECBU	67 ans	Homme
220015	<i>Staphylococcus aureus</i>	ECBU	68 ans	Homme
90161	<i>Enterococcus faecalis</i>	ECBU	2 mois 17 jours	Homme
160189	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	PDP	18 ans	Homme
280291	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ECBU	65 ans	Homme
20132	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	12 ans	Homme
260152	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	48 ans	Femme
300066	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	77 ans	Femme
40060	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	75 ans	Homme
50097	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	68 ans	Homme
140099	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	53 ans	Homme
130138	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	81 ans	Femme
180132	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	50 ans	Femme
290017	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	86 ans	Homme
300071	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	18 ans	Femme
300054	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	62 ans	Homme
290018	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	77 ans	Homme
280088	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	68 ans	Femme
290082	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	37 ans	Femme
31107	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ECBU	67 ans	Femme
400037	<i>Staphylococcus aureus</i>	Prélèvement conjonctival	73 ans	Homme
60159	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prélèvement de pus	76 ans	Femme
50004	<i>Escherichia coli</i>	ECBU	86 ans	Homme
50033	<i>Escherichia coli</i>	Sonde urinaire	59 ans	Homme

Il est à noter que les infections touchent majoritairement les personnes âgées (60%) avec une répartition de 72,22% et de 27,77% entre les hommes et les femmes respectivement. La deuxième tranche d'âge concerne les adultes entre 19 et 59 ans, avec un pourcentage de 27% et une répartition de 50% entre les hommes et les femmes. Enfin, les enfants et les nouveaux nés avec une prévalence de 10% et 3% dans chaque catégorie (**Figure 36**).

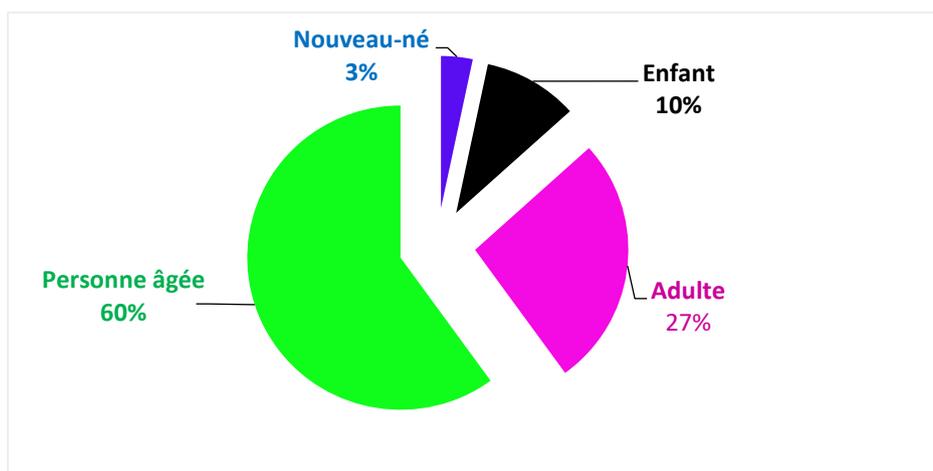


Figure 36. Répartition des infections dues aux BMRé selon l'âge

Pour l'ensemble des BMRé retenues, *Escherichia coli* est l'espèce la plus abondante (53%), suivie par *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus spp* avec une abondance de 10%. Viennent ensuite *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* avec 7% et *Salmonella spp* avec 3% (**Figure 37**).

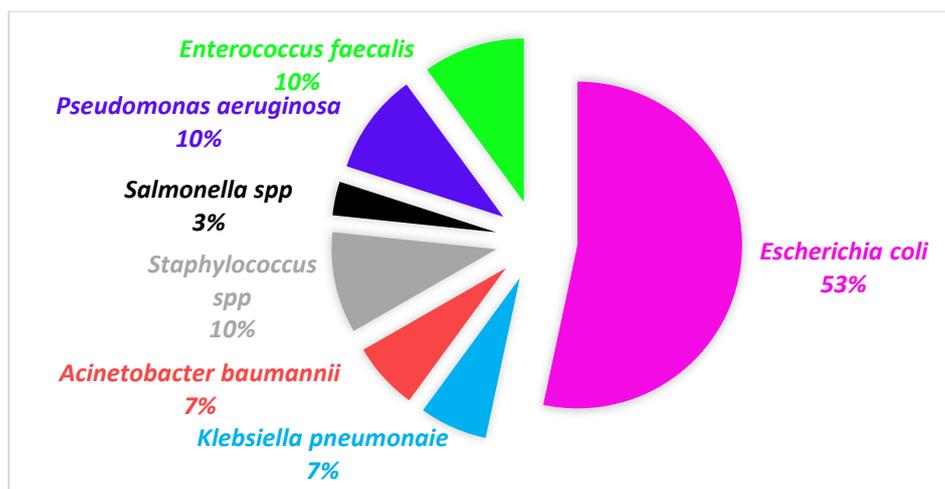


Figure 37. Répartition des BMRé retenues en fonction de l'espèce

2. Antibiogramme

Pour chaque antibiogramme, la famille des antibiotiques testée, la charge du disque utilisé et la lecture des résultats (diamètre de zone d'inhibition) varie d'une espèce pathogène à une autre (norme EUCAST-SFM). Les résultats des différents antibiogrammes sont représentés dans les tableaux 27 - 28, 29, 30, 31 et 32 ; respectivement pour les entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp* et *Escherichia coli*), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus spp.* Il est à noter que tous les antibiotiques testés sont ceux auxquels les espèces en question sont initialement censées être sensibles et que toutes les résistances observées sont des résistances acquises.

Ci-dessous, un exemple d'antibiogramme réalisé pour *Acinetobacter baumannii* 160189 et *Klebsiella pneumoniae* 290083, deux souches hautement résistantes. Il y a en effet, une absence totale de zone d'inhibition significative pour la première (a) et une seule zone pour la deuxième (b) (**Figure 38**).

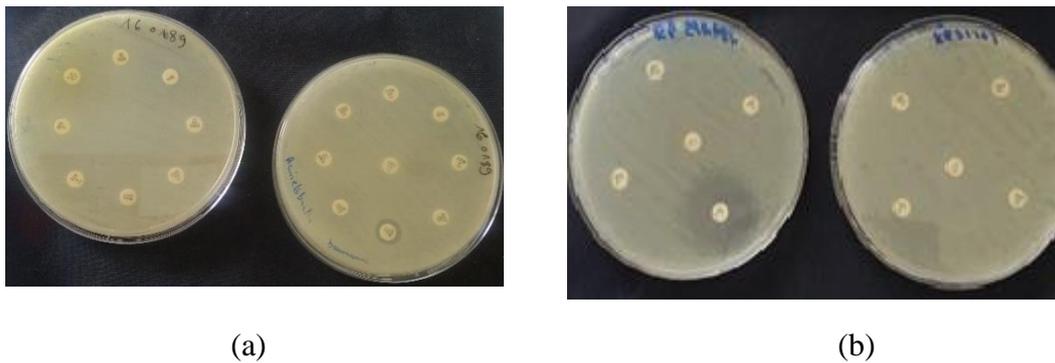


Figure 38. Exemple d'antibiogramme : (a) *Acinetobacter baumannii* complex 160189, (b) *Klebsiella pneumoniae* 290083

Tableau 27. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d'entérobactéries (*Klebsiella spp*, *Salmonella spp*)

Classe	Antibiotique	Charge de disque (µg)	Sensibilité en fonction du diamètre des zones d'inhibition (mm)			Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
			Sensible ≥	Intermédiaire	Résistante <	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 31107	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 290083	<i>Salmonella spp</i> 290146
Aminoglycosides	Amikacin	30	16	13-15	13	16	15	0
	Gentamycine	10	17	14-16	14	14	19	10
	Tobramycine	10	17	14-16	14	6	8	6
Cephalosporines	Cefaclor	30	-	-	-	0	0	0
	Cefixime	5	17	-	17	0	0	19
	Cefotaxime	30	20	17-19	17	0	0	18
	Ceftazidime	10	22	19-21	19	0	5	15
	Ceftriaxone	30	25	22-24	22	0	10	29
Pénicillines	Amoxicilline	20	19	-	19	0	0	0
	Amoxicilline-acide clavulanique	20 + 10	19	-	19	19	0	0
	Ampicilline	10	14	-	14	0	10	0
	Piperacilline	30	20	17-19	17	0	0	0
	Ticarcilin	75	23	20-22	20	0	0	0
Quinolones	Acide nalidixique	30	19	14-18	14	0	22	0
	Ciprofloxacine	5	26	24-25	24	0	30	40
	Levofloxacine	5	23	19-22	19	6	27	25
	Norfloxacine (ECBU uniquement)	10	22	19-21	19	10	26	26
	Ofloxacin	5	24	22-23	22	0	29	27
Phénicoles	Chloramphenicol	30	17	-	17	22	0	15
Carbapénems	Imipenem	10	22	16-21	16	27	26	14
Sulfamides	Triméthoprim-sulfaméthoxazole	1.25 + 23.75	14	11-13	11	0	0	16
Polypeptides	Colistine					Absence de corrélation CMI/ diamètre		
Autres	Fosfomycine	200	19	-	19	20	29	40
	Nitrofurantoin	10	11	-	11	12	12	0

Sur un total de 23 antibiotiques testés, les deux souches de *Klebsiella pneumoniae* 31107 et 290083 et la souche de *Salmonella spp* 29146 ont montré une résistance vis-à-vis de 17, 13 et 14 antibiotiques respectivement, soit un taux de résistance de 73,91%, 56,52% et 60,86%. Pour les trois souches, les résistances les plus fortes ont été observées vis-à-vis des classes des aminoglycosides, des céphalosporines, des pénicillines et des sulfamides (**Tableau 27, Figure 39**).

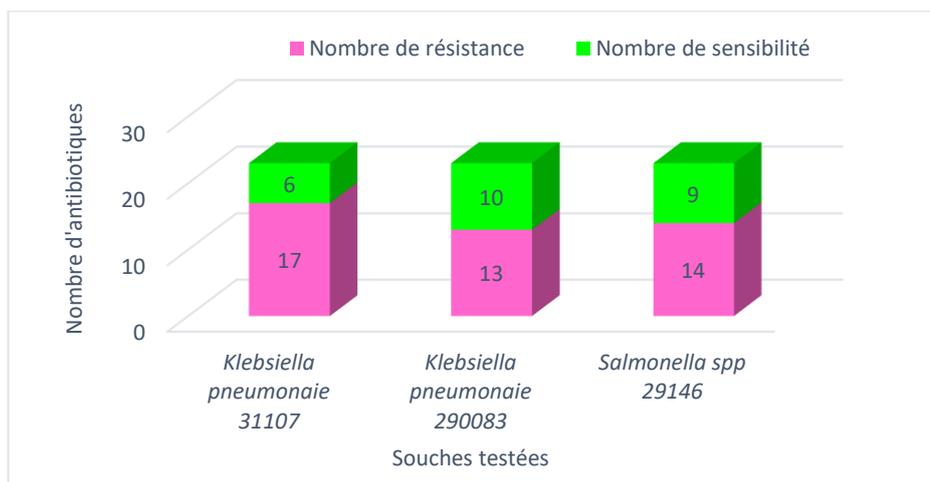


Figure 39. Taux de résistance des entérobactéries testées vis-à-vis de 23 antibiotiques appartenant à différentes classes

Tableau 28. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d'entérobactéries (*Escherichia coli*)

Classe	Antibiotique	Charge de disque (µg)	Sensibilité en fonction du diamètre des zones d'inhibition (mm)			Diamètre des zones d'inhibition (mm)															
			Sensible ≥	Intermédiaire	Résistante <	EC 20132	EC 260152	EC 300066	EC 40060	EC 500097	EC 140099	EC 130138	EC 180132	EC 290017	EC 300071	EC 300054	EC 290018	EC 50004	EC 280088	EC 290082	EC 50033
Aminoglycosides	Amikacin	30	16	14-15	13	15	16	17	16	0	15	16	16	15	16	16	17	21	16	17	19
	Gentamycine	10	17	14-16	14	13	18	20	17	0	20	10	0	0	19	20	19	10	18	0	0
	Tobramycine	10	17	14-16	14	11	13	13	0	0	12	0	0	10	14	8	14	14	9	11	9
Cephalosporines	Cefaclor	30	-	-	-	0	0	21	0	0	0	0	0	21	23	21	0	0	20	0	
	Cefixime	5	17	-	17	18	0	19	0	0	0	0	10	19	19	19	0	0	19	0	
	Cefotaxime	30	20	17-19	17	21	0	22	0	0	0	0	11	25	25	23	0	0	22	0	
	Ceftazidime	10	22	19-21	19	25	31	26	0	0	0	0	12	27	26	23	0	0	24	0	
	Ceftriaxone	30	25	22-24	22	26	0	27	0	0	0	0	10	26	29	29	0	0	27	0	
Pénicillines	Amoxicilline	20	19	-	19	0	22	0	10	0	0	0	0	10	8	0	0	0	0	0	
	Amoxicilline-acide clavulanique	20 + 10	19	-	19	0	10	0	19	0	0	0	0	19	20	0	0	0	0	0	
	Ampicilline	10	14	-	14	0	6	0	8	0	0	0	0	8	10	0	0	0	0	0	
	Piperacilline	30	20	17-19	17	0	13	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	15	0		
	Ticarcilin	75	23	20-22	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	
Quinolones	Ciprofloxacine	5	26	24-25	24	0	30	0	0	0	0	0	31	0	0	0	0	30	0		
	Levofloxacine	5	23	19-22	19	10	29	0	0	10	0	0	29	0	0	0	0	29	26		
	Norfloxacine	10	22	19-21	19	0	26	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	26	0		
	Ofloxacine	5	24	22-23	22	0	28	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	30	0		
Carbapénems	Imipenem	10	22	16-21	16	26	29	26	26	14	24	25	25	24	26	25	23	25	26	24	
Sulfamides	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	1.25 + 23.75	14	11-13	11	0	0	14	0	0	14	0	0	19	18	16	0	17	0	0	
Polypeptides	Colistine	Absence de corrélation CMI/ diamètre																			
Autres	Fosfomycine	200	19	-	19	35	40	40	0	0	39	40	36	35	20	25	38	29	30	27	17
	Nitrofurantoin	100	11	-	11	12	12	12	11	0	0	13	12	13	12	14	13	12	12	0	0

Sur un total de 21 antibiotiques testés, les 16 souches d'*Escherichia coli*, ont montré une forte résistance vis-à-vis des principales classes utilisées en thérapie humaine comme les aminoglycosides, les pénicillines, les quinolones et les pénicols. La souche *Escherichia coli* 500097, par exemple, a montré une résistance à tous les antibiotiques testés, soit une prévalence de 100% de résistance (**Tableau 28, Figure 40**).

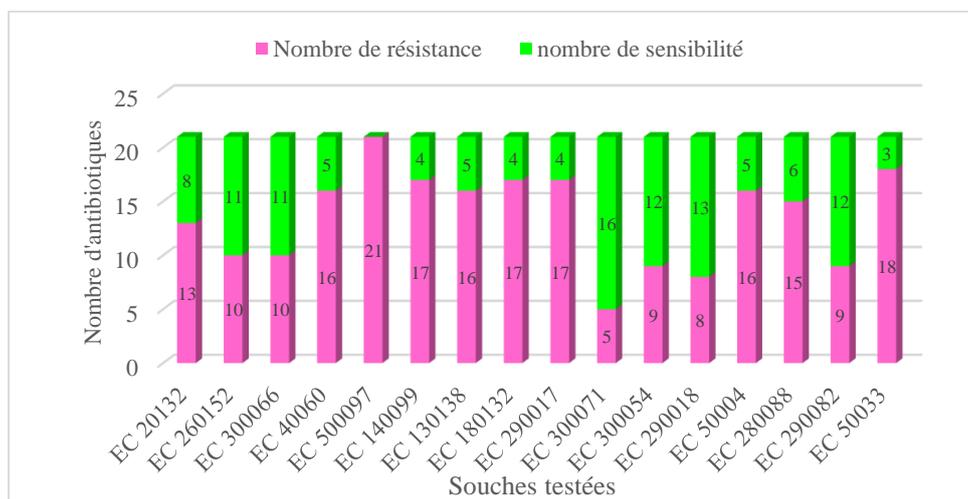


Figure 40. Taux de résistance des différentes souches d'*Escherichia coli* testées vis-à-vis de 21 antibiotiques appartenant à différentes classes

Tableau 29. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d'*Acinetobacter spp*

Classe	Antibiotique	Charge de disque (µg)	Sensibilité en fonction du diamètre des zones d'inhibition (mm)			Diamètre des zones d'inhibition (mm)	
			Sensible ≥	Intermédiaire	Résistante <	<i>Acinetobacter baumannii</i> 280291	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex 160189
Aminoglycosides	Amikacin	30	19	17-18	17	0	15
	Gentamycine	10	17	-	17	0	0
	Tobramycine	10	17	-	17	0	0
Cephalosporines	Cefixime	5	27	21-26	21	0	0
	Cefotaxime	30	23	15-22	15	0	0
	Ceftazidime	30	18	15-17	15	0	0
	Ceftriaxone	30	21	14-20	14	0	0
Pénicillines	Piperacilline	30	21	18-20	18	0	0
	Ticarcilin	75	20	15-19	15	0	0
Quinolones	Ciprofloxacine	5	50	21-49	21	0	0
	Levofloxacine	5	23	20-22	20	0	10
	Norfloxacine	10	CIP			0	0
	Ofloxacine	5	CIP			0	0
Carbapenems	Imipenem	10	24	21-23	21	0	40
Tetracyclines	Tétracycline	30	15	12-14	12	0	0
Sulfamides	Triméthoprim-sulfaméthoxazole	1,25 + 23,75	14	11-13	11	0	14
Polypeptides	Colistine					Absence de corrélation rapport diamètre/ CMI	

Les deux souches d'*Acinetobacter baumannii* ont montré une résistance vis-à-vis de toutes les classes d'antibiotiques testées, à savoir : les aminoglycosides, les céphalosporines, les pénicillines, les quinolones, les carbapenems, les tétracyclines et les sulfamides. Ainsi, sur un total de 16 antibiotiques, *Acinetobacter baumannii* 280291 et 160189 ont montré un taux de résistance de 100% et 87,5% respectivement (**Tableau 29, Figure 41**).

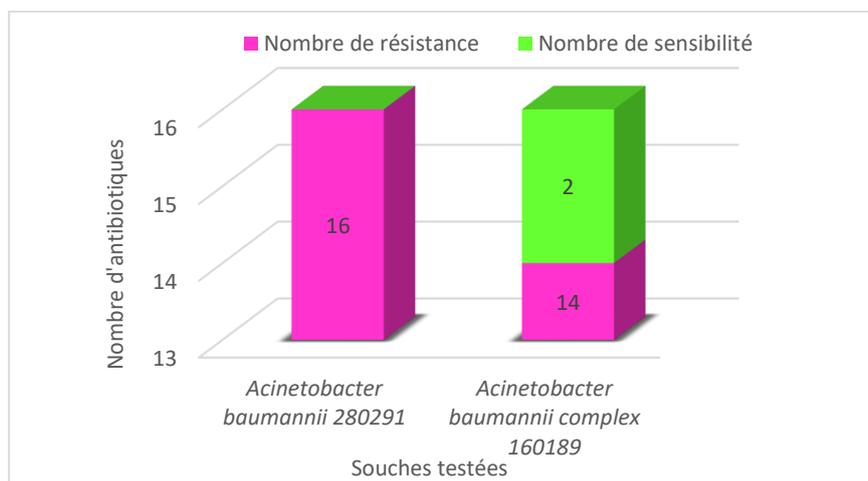


Figure 41. Taux de résistance des deux souches d'*Acinetobacter baumannii* testées vis-à-vis de 16 antibiotiques appartenant à différentes classes

Tableau 30. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques de *Pseudomonas spp*

Classe	Antibiotique	Charge de disque (µg)	Sensibilité en fonction du diamètre des zones d'inhibition (mm)			Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
			Sensible ≥	Intermédiaire	Résistante <	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 60125	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 230173	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 60159
Aminoglycosides	Amikacin	30	18	15-17	15	20	19	12
	Gentamycine	10	15	-	15	16	16	0
	Tobramycine	10	16	-	16	16	17	0
Céphalosporines	Ceftazidime	10	16	-	16	10	21	9
Penicillines	Piperacillin	30	18	-	18	30	19	10
	Ticarcilin	75	18	-	18	14	16	0
Quinolones	Ciprofloxacine	5	26	-	26	28	30	0
	Levofloxacine	5	22	-	22	30	23	15
Carbapenems	Imipenem	10	20	17-19	17	25	25	0
Polypeptides	Colistine		Absence de corrélation CMI/ Diamètre					
Autres	Fosfomycin	200	6	-	6	35	12	40

La souche *Pseudomonas aeruginosa* 60139 a montré une forte résistance vis-à-vis de 9 antibiotiques sur les 10 qui ont été testés (90%). Les deux autres souches, quant à elles, ont montré une plus faible résistance, 20% chacune (**Tableau 30, Figure 42**).

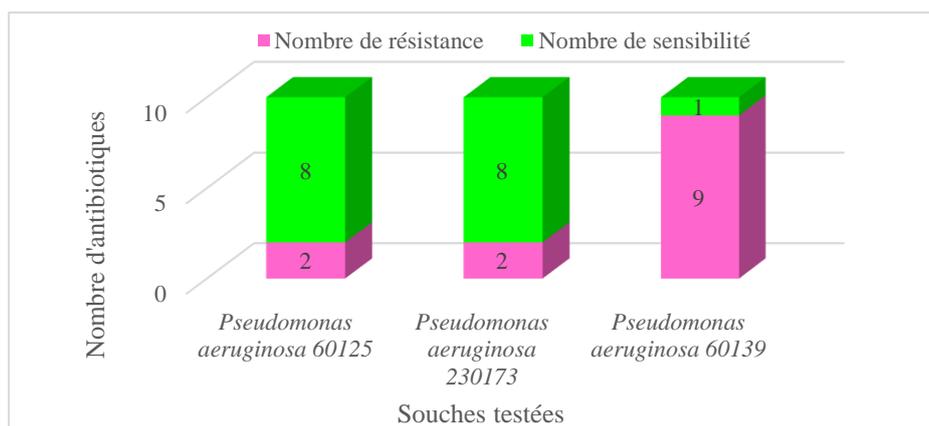


Figure 42. Taux de résistance des trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* testées vis-à-vis de 10 antibiotiques appartenant à différentes classes

Tableau 31. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques de *Staphylococcus spp*

Classe	Antibiotique	Charge de disque (µg)	Sensibilité en fonction du diamètre des zones d'inhibition (mm)			Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
			Sensible ≥	Intermédiaire	Résistante <	<i>Staphylococcus aureus</i> 400037	<i>Staphylococcus aureus</i> 220015	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 240001
Aminoglycosides	Amikacin	30	24	18-23	18	20	15	16
	Gentamycine	10	18	-	18	18	18	21
	Kanamycin	30	18	-	18	17	15	0
	Tobramycine	10	18	-	18	16	12	21
Cephalosporines	Cefaclor	30	22	-	22	17	30	21
	Cefixime	5	Cet antibiotique n'est pas utilisé pour le traitement des infections à staphylocoques					
	Cefotaxime	30	22	-	22	22	24	0
	Ceftazidime	10	Cet antibiotique n'est pas utilisé pour le traitement des infections à staphylocoques					
	Ceftriaxone	30	22	-	22	30	26	10
	Cefalotin	30	22	-	22	24	30	23
	Cefuroxime	30	22	-	22	25	30	22
Pénicillines	Amoxicilline	25	18	-	18	16	10	0
	Amoxicilline-acide clavulanique	20 + 10	25	19-24	19	17	25	0
	Ampicillin	10	18	-	18	13	10	0
	Pénicilline G	1UI	26	-	26	11	14	0
Quinolones	Ciprofloxacine	5	21	-	21	18	21	16
	Levofloxacine	5	22	-	22	25	22	0
	Norfloxacine	5	24	18-23	18	29	24	0
	Ofloxacine	5	20	-	20	25	20	0
Phenicols	Chloramphenicol	30	18	-	18	28	28	20
Lincosamides	Clindamycine	2	22	19-21	19	26	25	15
Macrolides	Erythromycine	15UI	21	13-20	13	27	25	26
Sulfamides	Triméthoprim-sulfaméthoxazole	1,25 + 23,75	17	14-16	14	16	25	16
Rifamycines	Rifampicin	5	26	23-25	23	40	36	24
Tétracyclines	Tétracycline	30UI	22	19-21	19	37	19	17
Glycopeptides	Vancomycine	5	Par microdilution CMI					
Autres	Fosfomycine	200	23	-	23	39	40	30
	Nitrofurantoin	100	13	-	13	22	21	19
	Acide fusidique	10	24	-	24	29	26	0

Trois souches de *Staphylococcus spp* ont été testées vis-à-vis de 26 antibiotiques. Les trois souches ont montré une résistance vis-à-vis des quatre principales classes, à savoir : les aminoglycosides, les céphalosporines, les pénicillines et les quinolones avec une prévalence de 57,69% pour *Staphylococcus epidermidis* 24001, de 30,76% pour *Staphylococcus aureus* 400037 et de 23,07% pour *Staphylococcus aureus* 220015 (Tableau 31, Figure 43).

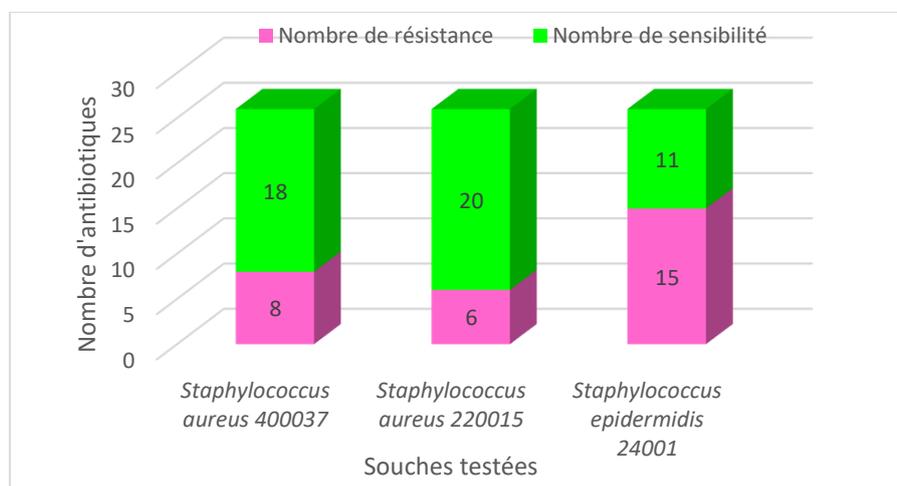


Figure 43. Taux de résistance des trois souches de *Staphylococcus spp* testées vis-à-vis de 26 antibiotiques appartenant à différentes classes

Tableau 32. Résultats de l'antibiogramme des isolats cliniques d'*Enterococcus faecalis*

Classe	Antibiotique	Charge de disque (µg)	Sensibilité en fonction du diamètre des zones d'inhibition (mm)			Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
			Sensible ≥	Intermédiaire	Résistante <	<i>Enterococcus faecalis</i> 300043	<i>Enterococcus faecalis</i> 250095	<i>Enterococcus faecalis</i> 90161
Aminoglycosides	Amikacin	30	10	8-9	8	0	0	0
	Gentamycine	30	8	-	8	8	0	9
	Streptomycine	300	19	14-18	14	0	0	0
Pénicillines	Amoxicilline	20	10	8-9	8	25	5	10
	Amoxicilline-acide clavulanique	20 + 10	10	8-9	8	30	12	12
	Ampicilline	2	10	8-9	8	25	0	10
	Pénicilline G	1	26	-	26	0	0	0
	Piperacilline	30	10	8-9	8	25	29	25
Quinolones	Ciprofloxacine	5	25	19-24	19	25	0	18
	Levofloxacine	5	15	-	15	19	0	20
	Norfloxacine	10	12	-	12	15	0	17
Phenicols	Chloramphenicol	30	18	13-17	13	25	12	25
Carbapenems	Imipenem	10	21	18-20	18	25	22	30
Rifamycin	Rifampicin	5	20	17-19	17	30	19	18
Sulfamides	Trimethoprim-sulfaméthoxazole	1,25 + 23,75	50	21-49	21	23	24	30
Glycopeptides	Vancomycine	5	12	-	12	17	11	11
Polypeptides	Colistine					Absence de corrélation CMI/ diamètre		
Autres	Fosfomycine	200	16	13-15	13	8	20	23
	Nitrofurantoin	100	15	-	15	20	16	16

Toutes les espèces d'*Enterococcus* sont naturellement résistantes aux céphalosporines

La résistance de la souche d'*Enterococcus faecalis* 250095 vis-à-vis des antibiotiques appartenant à la classe des aminoglycosides, des pénicillines et des quinolones a été plus importante (61,11%) que celle des deux souches d'*Enterococcus faecalis* 300043 et d'*Enterococcus faecalis* 90161, soit 22,22% chacune (**Tableau 32, Figure 44**).

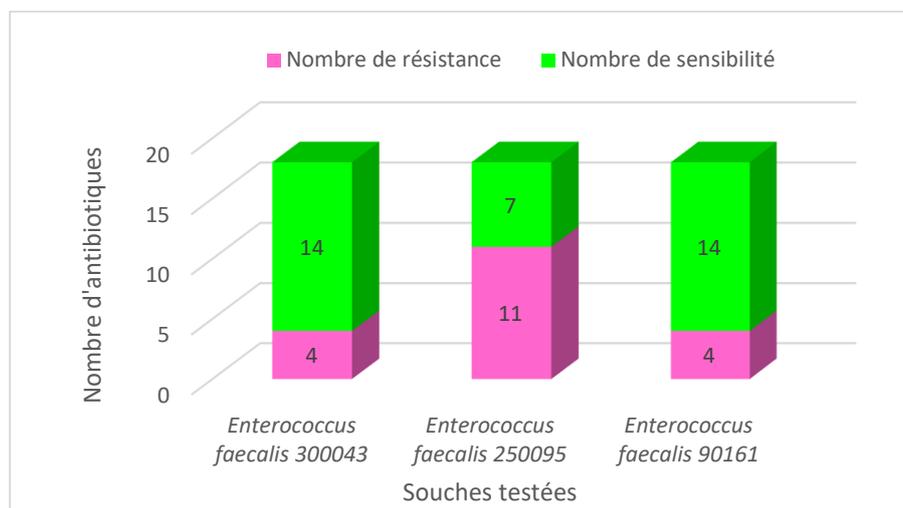


Figure 44. Taux de résistance des trois souches d'*Enterococcus faecalis* testées vis-à-vis de 18 antibiotiques appartenant à différentes classes

3. CMI des antibiotiques contre les BMRe sélectionnées

Au vu des résultats de l'antibiogramme, les sept souches les plus résistantes ont été sélectionnées pour la suite des expériences et seulement huit antibiotiques ont été retenus en fonction de leur activité (inefficacité) et de leur appartenance à différentes familles. Un test de la dilution critique a donc été fait en utilisant la méthode du « *spot on the lawn* » afin de déterminer les CMI des huit antibiotiques sur les souches sélectionnées.

Les résultats obtenus aussi bien pour la sensibilité que pour la résistance, pour les huit antibiotiques purs confirment ceux obtenus par l'antibiogramme (**Tableau 33**). La seule différence observée concerne la sensibilité à la gentamycine de *Salmonella spp* 290146, d'*Escherichia coli* 50009 et d'*Acinetobacter baumannii* 280291 avec une CMI de 60 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure 45**). Néanmoins, celle-ci est quatre fois plus importante que celle de la charge du disque (15 μg) et 15 fois plus élevée que la concentration critique recommandée par la norme EUCAST-SFM qui est de 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.



Figure 45. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la gentamycine vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii* 280291 via la technique « *the spot on the lawn* ». Les spots de A à H correspondent à une série de concentrations testées de 120 à 0,93 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Tableau 33. Valeurs des CMI des antibiotiques purs testés vis-à-vis de sept BMRe sélectionnées

Antibiotiques	Charge du disque (µg)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 31107		<i>Salmonella spp</i> 290146		<i>Escherichia coli</i> 500097		<i>Acinetobacter baumannii</i> 280291		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 230173		<i>Staphylococcus aureus</i> 400037		<i>Enterococcus faecalis</i> 300043	
		µg.ml ⁻¹													
		CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC
Ampicilline	10	>80	RN	>80	8	>80	8	>80	RN	>80	RN	>80	8	(S) 5	8
Amoxicilline	25	>200	RN	>200	8	>200	8	>200	RN	>200	RN	>200	8	(S) 6,25	8
Céfaclor	30	>240	ND	>240	ND	>240	ND	>240	RN	>240	RN	>240	4	>240	RN
Ciprofloxacine	5	>40	0,5	(S) 0,31	0,5	>40	0,5	>40	1	(S) 0,23	0,5	>40	1	(S) 1,25	2
Cefixime	5	>40	1	(S) 0,5	1	>40	1	>40	16	>40	RN	NA	NA	>40	RN
Cefotaxime	30	>240	2	(I) 1,87	2	>240	2	>240	32	>240	RN	(S) 4	4	>240	RN
Gentamycine	15	(I) 2,5	4	(RA) 60	4	(RA) 60	4	(RA) 60	4	(S) 3,75	4	(S) 0,9	1	(I) 30	128
Pénicilline G	6.25	>53	RN	>53	RN	>53	RN	>53	RN	>53	RN	>53	0.125	>53	ND

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CC : Concentration Critique (concentration minimale à partir de laquelle l'espèce est définie comme résistante, cette concentration varie en fonction de l'antibiotique et de l'espèce testés) ; NA : Non Applicable ; S : Sensible ; I : Intermédiaire ; RN : Résistance Naturelle ; RA : Résistance Acquisée ; ND : Non Déterminé.

4. Activité des bactériocines purifiées sur les BMRe sélectionnées

a. Activité des extraits de culture des souches productrices de bactériocines

Nous avons au total quatre souches productrices de bactériocines, à savoir, *Enterococcus durans* LC2 productrice de quatre bactériocines différentes (B1, B2, C1 et C2), *Lactococcus lactis* L17 productrice de la nisine Z, *Lactobacillus plantarum* L3 productrice de la pédiocine PA-1 et *Lactococcus lactis* EO24 productrice d'une bactériocine non encore identifiée.

Après mise en culture d'*Enterococcus durans* LC2 et de *Lactococcus lactis* EO24, leurs extraits de cultures ont été recueillis et testés via la technique du « spot on the lawn » contre les 30 souches pathogènes multi-résistantes sélectionnées (**Tableau 34**). Les résultats ont montré que les deux extraits de culture étaient actifs contre les bactéries à Gram+ et les bactéries à Gram -, avec respectivement des diamètres de zones d'inhibition variant de 12 à 14 mm et de 6 à 10 mm (**Tableau 34, Figure 46**).

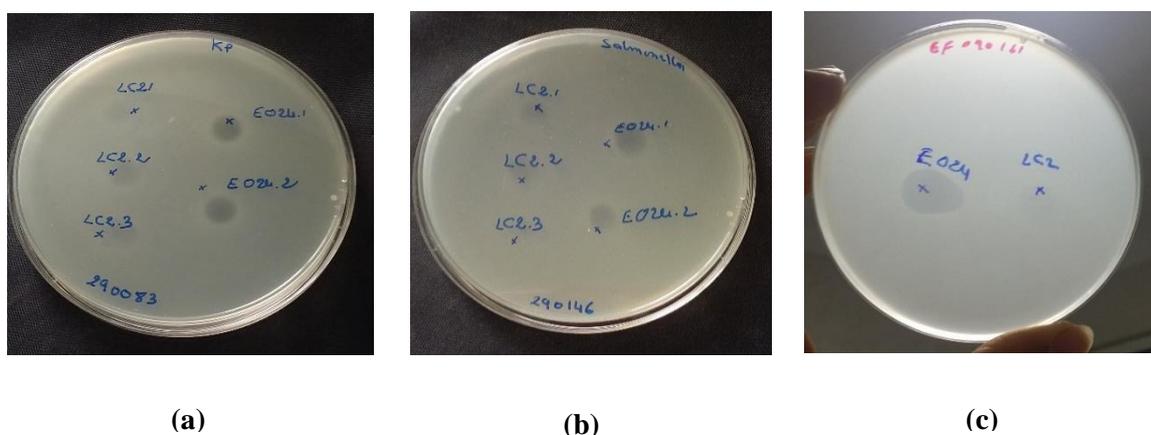


Figure 46. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet des extraits de culture d'*Enterococcus durans* LC2 et de *Lactococcus lactis* EO24 via la technique du « spot on the lawn ». Les photos montrent l'effet antibactérien vis-à-vis de trois souches indicatrices : (a) *Klebsiella pneumoniae* 290083, (b) *Salmonella* spp 290146 et (c) *Enterococcus faecalis* 90161

Tableau 34. Activité des extraits de culture des souches LC2 et EO24 contre des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques

Famille	Référence	Germe	Diamètre de zone d'inhibition en mm	
			LC2	EO24
<i>Enterobactéries</i> (Gram-)	290083	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	9
	31107	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp	0	9
	290146	<i>Salmonella</i> spp	6 ~	9
	20132	<i>Escherichia coli</i>	6 ~	10
	260152	<i>Escherichia coli</i>	7 ~	10
	300066	<i>Escherichia coli</i>	~	9
	40060	<i>Escherichia coli</i>	7 ~	9
	50097	<i>Escherichia coli</i>	6 ~	10
	140099	<i>Escherichia coli</i>	0	0
	130138	<i>Escherichia coli</i>	~	9 ~
	180132	<i>Escherichia coli</i>	0	0
	290017	<i>Escherichia coli</i>	~	9
	300071	<i>Escherichia coli</i>	7 ~	9
	300054	<i>Escherichia coli</i>	7 ~	9
	290018	<i>Escherichia coli</i>	~	9
	50004	<i>Escherichia coli</i>	0	0
	280088	<i>Escherichia coli</i>	6 ~	10
	290082	<i>Escherichia coli</i>	~	9
50033	<i>Escherichia coli</i>	~	~	
<i>Acinetobacter spp</i> (Gram-)	160189	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	9	8
	280291	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6 ~	9
<i>Pseudomonas spp</i> (Gram-)	60125	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	~	10
	230173	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 ~	7
	60159	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 ~	7
<i>Staphylococcus spp</i> (Gram+)	240001	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	~	~
	400037	<i>Staphylococcus aureus</i>	13	12
	220015	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	12
<i>Enterococcus spp</i> (Gram+)	300043	<i>Enterococcus faecalis</i>	14	12
	250095	<i>Enterococcus faecalis</i>	14	12
	90161	<i>Enterococcus faecalis</i>	12	13

(~) zone trouble, (-) : absence de zone d'inhibition.

b. CMI des bactériocines purifiées contre les BMRe sélectionnées

L'effet antibactérien des bactériocines purifiées a été étudié contre toutes les souches pathogènes retenues, sauf celles d'*Escherichia coli* dont seulement cinq des 16 souches ont été testées (Tableau 35).

La nisine Z purifiée n'a montré aucun effet contre les souches à Gram- sauf *Pseudomonas aeruginosa* 230173 contre laquelle une CMI de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a été mesurée. Par contre, vis-à-vis des souches à Gram+ l'effet a été positif avec des CMI de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ contre la plupart des souches et seulement de 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ contre *Enterococcus faecalis* 90161 par exemple (**Tableau 35 ; Figure 47**).



Figure 47. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la nisine Z purifiée vis-à-vis de l'*Enterococcus faecalis* 250095. Les spots de A à H correspondent à une série de solutions de 500 à 3,9 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les deux zones d'inhibition obtenues correspondent aux concentrations 500 (A) et 250 (B) $\mu\text{g.ml}^{-1}$

De même, pour la nisine A commerciale, aucun effet contre toutes les souches à Gram- n'a été détecté. Les souches à Gram+ ont, elles été toutes sensibles avec des CMI plus faibles que celles obtenues avec la nisine A purifiée, allant de 125 à 24,4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Par ailleurs, la pédiocine PA-1 purifiée à partir de *Lactobacillus plantarum* L3 était inactive envers toutes les bactéries à Gram- testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* 230173 avec une CMI de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. A l'inverse, contre les bactéries à Gram+, la pédiocine PA-1 a montré une activité significative vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis* 90161, 300043 et 250095 (**Figure 48**) avec des CMI très faibles, de l'ordre de 0,48 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et une CMI de de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 220015 (**Tableau 35**).



Figure 48. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la pédiocine PA-1 purifiée vis-à-vis de l'*Enterococcus faecalis* 250095. Les spots de A à H correspondent à une série de solutions de 500 à 3,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Des zones d'inhibitions ont été obtenues pour toutes les concentrations testées

D'autre part, la combinaison nisine A/pédiocine PA-1 a montré un effet très significatif vis-à-vis des souches à Gram + avec des CMI très faibles allant de 15,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ à 0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ chacune (**Figure 49**).

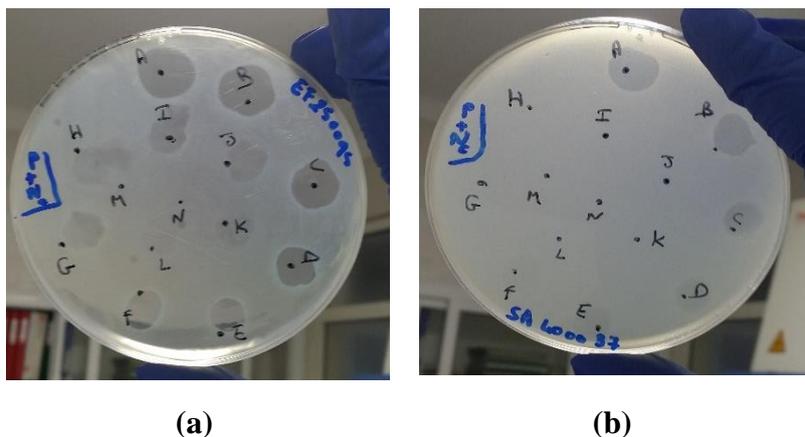


Figure 49. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la combinaison nisine A/pédiocine PA-1. Les spots de A à N correspondent à des séries de solutions de 250/250 à 0,12/0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La dernière zone d'inhibition obtenue correspond à la concentration 0,24/0,24 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (K) vis-à-vis de l'*Enterococcus faecalis* 250095 (a) et à la concentration 15,62/15,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (E) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 400037 (b)

La bactériocine EO24/C non encore identifiée n'a montré aucune activité antibactérienne vis-à-vis de l'ensemble des bactéries multi-résistantes testées que ce soit les bactéries à Gram- ou à Gram+ même à des concentrations de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (**Tableau 35**).

Les deux bactériocines B1 et B2, seules ou en combinaison (B1+B2) n'ont montré aucune activité vis-à-vis de toutes les bactéries à Gram- testées, même à des concentrations de 500

$\mu\text{g.ml}^{-1}$. Par contre, vis-à-vis des bactéries à Gram +, une sensibilité (CMI de $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$) a été observée avec les deux bactériocines seules et en combinaison (**Tableau 35**).

Les bactériocines C1, C2 et B1, B2 sont à priori identiques, cependant, leur activité s'est avérée différente vis-à-vis des BMRe testées. Ainsi, alors que les deux bactériocines B1, B2 n'ont montré aucun effet contre les bactéries à Gram-, les deux bactériocines C1 et C2 ont un effet contre deux bactéries à Gram- à savoir *Klebsiella pneumoniae* 290083 et *Acinetobacter baumannii* 280291 avec une CMI de $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure 50**). De plus, leur combinaison (C1+C2) a montré un effet plus important se traduisant par des CMI plus faibles de l'ordre de $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ dans le cas de *Klebsiella pneumoniae* 290083, et cet effet a été synergique dans le cas d'*Acinetobacter baumannii* 280291 avec une CMI de $7,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Tableau 35 ; Figure 50**). Il faut également noter l'apparition d'une sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* 230173 vis-à-vis de cette combinaison, alors même que ces deux bactériocines testées séparément n'avaient pas d'effet.

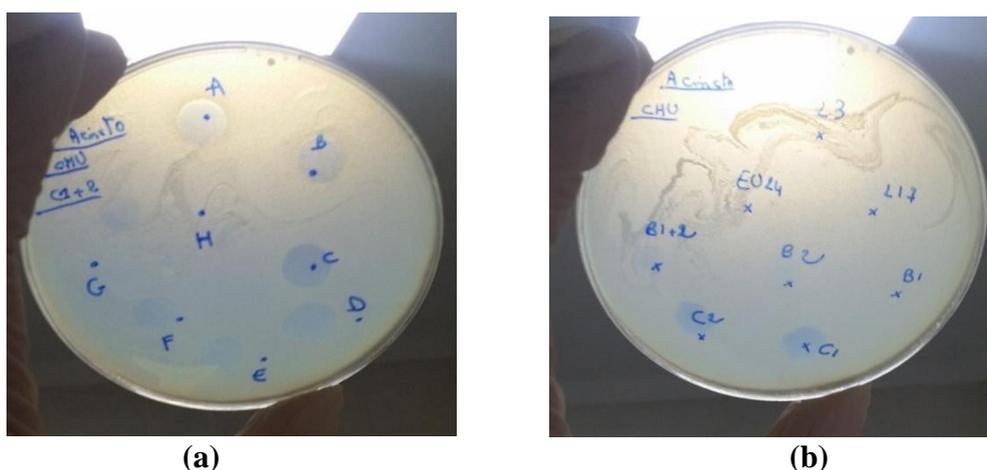


Figure 50. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la bactériocine C1 et C2 seules et en combinaison vis-à-vis de l'*Acinetobacter baumannii* 280291. (a) Les spots de A à H correspondent à une série de solutions (de la combinaison C1+C2) de $500/500$ à $3,9/3,9 \mu\text{g.ml}^{-1}$, la dernière zone d'inhibition obtenue correspond à la concentration $7,81/7,81 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (G) ; (b) les spots déposés correspondent à des dilutions de la solution pure des bactériocines purifiées (B1, B2, C1, C2, EO24, L17 et L3) variant entre 1000 à $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$, les seules zones d'inhibition obtenues correspondent à des CMI de $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour les bactériocine C1 et C2

Contre les bactéries à Gram+, les deux bactériocines ont également montré une activité significative variant de $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour *Enterococcus faecalis* 250095 à $31,2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour *Enterococcus faecalis* 90161. Leur combinaison a montré un effet synergique très significatif allant de $62,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ à $7,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$. La **figure 51** montre un exemple de synergie entre ces deux bactériocines vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 220015.



(a)

(b)

(c)

Figure 51. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet des bactériocines C1(a) et C2 (b) seules et en combinaison (c) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 220015. Les spots de A à H correspondent à une série de solutions de 1000 à 7,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (a et b) et de 500/500 à 3,9/ 3,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (c). La dernière zone d'inhibition obtenue correspond à la concentration (F) 31,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (a), à (E) 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (b) et à (F) 15,62/15,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (c)

Tableau 35. Activité des bactériocines B1, B2, C1 et C2 seules, puis en combinaison B1+B2 et C1+C2, activité de la nisine Z purifiée, de la nisine A commerciale, de la pédiocine PA-1 purifiée, de la combinaison nisine A+ pédiocine PA-1 et de la bactériocine EO24/C non identifiée vis-à-vis d'une série de BMRe aux antibiotiques

Bactériocines	Concentration minimale inhibitrice en µg.ml ⁻¹																
	Gram-										Gram+						
	Entérobactéries								<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>				
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Salmonella spp</i>	<i>Escherichia coli</i>													
	290083	31107	290146	20132	260152	300066	300054	500097	160189	280291	60125	230173	220015	400037	300043	250095	90161
*Nisine Z	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	500	500	500	250	125	
**Nisine A c	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	96	125	125	> 500	24
***Pédiocine PA-1	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	500	500	> 500	0,49	0,49	0,49
Nisine A / pédiocine PA-1	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	ND	ND	ND	ND	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	15,62 /15,62	15,62 /15,62	0,12 /0,12	0,24 /0,24	ND
****EO24/C	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
B1	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	500	500	500
B2	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	500	> 500	> 500	500	500
B1/B2	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	> 250/ > 250	250/ 250	> 250/ > 250	250/ 250	250/ 250	250/ 250
C1	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	62,50	250	125	31,25	31,25
C2	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	62,50	250	62,50	250	62,50
C1/C2	500/ 500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	7,81/ 7,81	>500/ >500	250/ 250	15,62/ 15,62	62,50/ 62,50	7,81/ 7,81	15,62/ 15,62	7,81/ 7,81

B1 : entérocyne L50A, B2 : forme modifiée de l'entérocyne L50B, C1 : fragment actif de l'entérocyne L50A, C2 : fragment actif de l'entérocyne L50B. *Nisine Z produite par *Lactococcus lactis* L17, ** Nisine A_c nisine commerciale, *** Pédiocine PA-1 produite par *Lactobacillus plantarum* L3, **** EO24/C bactériocine -non identifiée- produite par *Lactococcus lactis* EO24, ND : Non Déterminé

5. Activité des combinaisons bactériocine/antibiotique sur les BMRe sélectionnées

Différentes combinaisons d'antibiotiques et de bactériocines purifiées ont été testées afin d'évaluer les éventuels effets potentialisateurs des bactériocines sur les antibiotiques ou les effets synergiques entre les deux familles d'antimicrobiens. Un effet potentialisateur se manifeste par l'apparition d'une sensibilité vis-à-vis d'un agent antimicrobien, en présence d'un autre agent initialement actif. Par contre, un effet synergique se produit lorsque les deux antimicrobiens agissent en combinaison pour rendre la cellule cible, initialement résistante aux deux antimicrobiens, sensible.

Comme pour les tests effectués pour les antibiotiques purs, la combinaison antibiotique/bactériocine a été testée contre les sept souches les plus résistantes. Dans un souci de clarté et afin d'alléger la présentation des résultats, ne seront décrits que ceux relatifs aux souches *Escherichia coli* 500097, *Acinetobacter baumannii* 280291 et *Staphylococcus aureus* 400037.

Concernant la souche *Escherichia coli* 500097 aucune des combinaisons testées n'a eu d'effet sur sa résistance (**Tableau 38**). Contre *Acinetobacter baumannii* **280291**, l'effet combiné antibiotique/bactériocine a été testé en raison de son niveau élevé de résistance aux deux familles d'antimicrobiens. Ainsi, on a noté l'apparition d'une sensibilité à la ciprofloxacine avec une CMI de $1,25 \mu\text{g.ml}^{-1}$, en présence des deux bactériocines nisine A ($250 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et pédiocine PA-1 ($250 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Cette sensibilité est apparue également en présence des bactériocines C1 et C2 (CMI de $0,62$ et de $1,25 \mu\text{g.ml}^{-1}$) respectivement. La combinaison des trois antimicrobiens (C1/C2/ciprofloxacine) a montré un effet synergique très significatif avec des CMI de $62,5$; $62,5$ et $0,62 \mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement pour C1, C2 et pour la ciprofloxacine.

Comme décrit plus haut, la souche *Acinetobacter baumannii* 280291 est sensible à la gentamycine seule, mais avec une CMI de $60 \mu\text{g.ml}^{-1}$ largement au-dessus de la norme recommandée par EUCAST. Cette sensibilité a été accrue en présence des deux bactériocines ; la nisine A ($125 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et la pédiocine PA-1 ($500 \mu\text{g.ml}^{-1}$) avec une CMI de la gentamycine passant de 60 à $3,75$ et à $15 \mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement. En présence des trois antimicrobiens, on a remarqué un effet synergique très marqué puisque les CMI ont été de $62,5$; $62,5$ et $3,75 \mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement pour la nisine A, la pédiocine PA-1 et la gentamycine. Cet effet synergique on l'a également noté en présence de la bactériocine B1 ($125 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et de la bactériocine C1

(250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), avec une CMI de la gentamycine passant de 60 à 7,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dans les deux cas (**Tableau 39**).

Les diverses combinaisons testées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 400037 ont montré des activités antimicrobiennes très marquantes. En effet, la combinaison de la nisine A avec les huit antibiotiques a mis en évidence un effet potentialisateur de cette bactériocine sur cinq antibiotiques. Cette activité se traduit par une sensibilité qui est apparue vis-à-vis de l'ampicilline, l'amoxicilline, le céfador, la ciprofloxacine et de la pénicilline G avec une CMI de 0,31 ; 0,78 ; 3,75 ; 0,62 et 0,19 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement (**Tableau 41 ; Figure 52**).

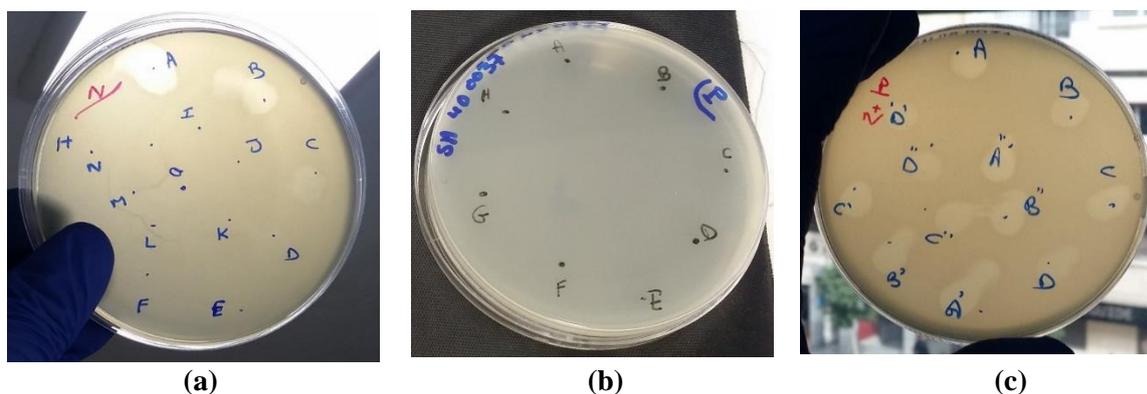


Figure 52. Exemple de zones d'inhibition obtenues sous l'effet de la nisine A (a) et de la pénicilline G (b) seules et en combinaison (c), par la méthode « spot on the lawn » vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 400037. (a) effet de la nisine à des concentrations allant de 1000 à 0,06 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (de A à O) ; les quatre zones d'inhibition obtenues correspondent à des concentrations de A 1000, B 500, C 250 et D 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. (b) effet de la pénicilline G à des concentrations de 53 à 0,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (A à H) ; aucune zone d'inhibition n'a été obtenue, (c) effet de la combinaison nisine A/pénicilline G testée à des concentrations de 500 à 62,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour la nisine A et de 6,25 à 0,19 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour la pénicilline G (de A à D''); 12 zones d'inhibitions ont été obtenues; le spot D'' correspond à la plus faible concentration obtenue qui est de 62,5 / 0,19 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour la nisine A et la pénicilline G respectivement

Les combinaisons avec la pédiocine PA-1 ont montré un effet potentialisateur avec deux antibiotiques, il s'agit de l'amoxicilline et du céfador avec une CMI de 25 et de 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement. Par contre, la combinaison de cette bactériocine avec la ciprofloxacine a montré un effet synergique, soit une CMI de 62,5 et de 0,62 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement (**Tableau 41**). Il est à noter qu'aucune activité n'a été observée suite à la combinaison des trois antimicrobiens (antibiotique/nisine/pédiocine) vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* 400037.

Les diverses combinaisons réalisées avec les deux bactériocines B1 et B2 ont également montré un effet synergique avec trois antibiotiques différents : céfador/B1 avec des CMI respectives de 15 et 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; ciprofloxacine /B1 avec des CMI respectives de 0,31 et 31,25

$\mu\text{g.ml}^{-1}$ et pénicilline G/B2 avec des CMI respectives de 41,66 et 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Il est à signaler que les huit antibiotiques et les deux bactériocines n'avaient aucune activité individuelle vis-à-vis de cette souche.

Pour l'ensemble des combinaisons testées avec les bactériocines C1 et C2 seules ou en combinaison, on a remarqué un effet potentialisateur de l'action de tous les antibiotiques, sauf dans le cas de la combinaison céfaclor /C1 et de la combinaison ciprofloxacine/C2 où on a noté un effet synergique (**Tableau 41**).

Tableau 36. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche de *Klebsiella pneumoniae* 31107 multi-résistante aux antibiotiques

Bactériocine + antibiotique ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 31107							
	Nisine A (>500)	Pediocin PA-1 (>500)	Nisine A + Pediocin PA-1 (>500/ >500)	B1 (>500)	B2 (>500)	C1 (>1000)	C2 (>1000)	C1+C2 (>500/ >500)
Ampicilline (>80)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Amoxicilline (>200)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN : TN (> 1 000 + > 50)	RN : TN (> 500 + > 500 + > 50)
Céfaclor (>240)	> 500 + > 30	> 500 + > 30	> 250 + > 250 + > 30	> 500 + > 60	ND	>1 000 + > 60	>1 000 + > 60	> 500 + > 500 + > 60
Ciprofloxacine (>40)	> 500 + > 5	> 500 + > 5	> 250 + > 250 + > 5	> 500 + > 10	ND	> 1 000 + > 10	> 1 000 + >10	> 500 + > 500 + >10
Cefixime (>40)	> 500 + > 5	> 500 + > 5	> 250 + > 250 + > 5	> 500 + > 10	ND	>1 000 + > 10	ND	ND
Cefotaxime (>240)	> 500 + > 30	> 500 + > 30	> 250 + > 250 + > 30	> 500 + > 60	ND	>1000 + > 60	ND	ND
Gentamycine (2,5)	I	I	I	I	I	I	I	I
Pénicilline G (>53)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN

RN : Résistance Naturelle ; TN : Témoin Négatif ; I : Intermédiaire ; ND : Non Déterminé. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la CMI individuelle de chaque agent antibactérien vis-à-vis de la souche testée.

NB : la CMI de la bactériocine est indiquée en premier, celle de l'antibiotique est en deuxième position.

Tableau 37. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche de *Salmonella spp* 290146 multi-résistante aux antibiotiques

Bactériocine + antibiotique ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	<i>Salmonella spp</i> 290146							
	Nisine A (>500)	Pediocin PA-1 (>500)	Nisine A + Pediocin PA-1 ($>500/ >500$)	B1 (>500)	B2 (>500)	C1 (>1000)	C2 (>1000)	C1+C2 ($>500/ >500$)
Ampicilline (>80)	$> 500 + > 10$	$> 500 + > 10$	$> 250 + > 250 + > 10$	$> 500 + > 20$	ND	$>1\ 000 + > 20$	$>1\ 000 + > 20$	$> 500 + > 500 + > 20$
Amoxicilline (>200)	$> 500 + > 25$	$> 500 + > 25$	$> 250 + > 250 + > 25$	$> 500 + > 50$	ND	$>1\ 000 + > 50$	$>1\ 000 + > 50$	$> 500 + > 500 + > 50$
Céfaclor (>240)	$> 500 + > 30$	$> 500 + > 30$	$> 250 + > 250 + > 30$	$> 500 + > 60$	ND	$>1\ 000 + > 60$	$>1\ 000 + > 60$	$> 500 + > 500 + > 60$
Ciprofloxacine (0,31)	S	S	S	S	S	S : TP (250 + 2,5)	S : TP (250 + 2,5)	S : TP (125 + 125 + 0,62)
Cefixime (0,5)	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxime (1,87)	I	I	I	I	I	I	I	I
Gentamycine (60)	500 + 15	250 + 7,5	$> 250 + > 250 + > 15$	125 + 3,75	ND	250 + 7,5	ND	ND
Pénicilline G (>53)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN

S : Sensible ; I : Intermédiaire ; RN : Résistance Naturelle ; ND : Non Déterminé ; TP : Témoin Positif. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la CMI individuelle de chaque agent antibactérien vis-à-vis de la souche testée. Les cases colorées montrent les résultats positifs obtenus pour l'ensemble des combinaisons testées.

NB : la CMI de la bactériocine est indiquée en premier, celle de l'antibiotique est en deuxième position.

Tableau 38. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche d'*Escherichia coli* 500097 multi-résistante aux antibiotiques

Bactériocine + antibiotique ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	<i>Escherichia coli</i> 500097							
	Nisine A (>500)	Pédiocine PA-1 (>500)	Nisine A + Pédiocine PA-1 (>500/ >500)	B1 (>500)	B2 (>500)	C1 (>1000)	C2 (>1000)	C1+C2 (>500/ >500)
Ampicilline (>80)	> 500 + > 10	> 500 + > 10	> 250 + > 250 + > 10	> 500 + > 20	> 500 + > 20	> 1 000 + > 20	>1 000 + > 20	> 500 + > 500 + > 20
Amoxicilline (>200)	> 500 + > 25	> 500 + > 25	> 250 + > 250 + > 25	> 500 + > 50	> 500 + > 50	>1 000 + > 50	>1 000 + > 50	> 500 + > 500 + > 50
Céfaclor (>240)	> 500 + > 30	> 500 + > 30	> 250 + > 250 + > 30	> 500 + > 60	> 500 + > 60	>1 000 + > 60	>1 000 + > 60	> 500 + > 500 + > 60
Ciprofloxacine (>40)	> 500 + > 5	> 500 + > 5	> 250 + > 250 + > 5	> 500 + > 10	> 500 + > 10	> 1 000 + > 10	> 1 000 + >10	> 500 + > 500 + >10
Cefixime (>40)	> 500 + > 5	> 500 + > 5	> 250 + > 250 + > 5	> 500 + > 10	ND	> 1 000 + > 10	ND	ND
Cefotaxime (>240)	> 500 + > 30	> 500 + > 30	> 250 + > 250 + > 30	> 500 + > 60	ND	>1000 + > 60	ND	ND
Gentamycine (60)	> 500 + > 15	> 500 + > 15	> 250 + > 250 + > 15	> 500 + > 30	ND	>1000 + > 30	ND	ND
Pénicilline G (>53)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN

RN : Résistance Naturelle ; ND : Non Déterminé. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la CMI individuelle de chaque agent antibactérien vis-à-vis de la souche testée.

NB : la CMI de la bactériocine est indiquée en premier, celle de l'antibiotique est en deuxième position.

Tableau 39. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche d'*Acinetobacter baumannii* 280291 multi-résistante aux antibiotiques

Bactériocine + antibiotique ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	<i>Acinetobacter baumannii</i> 280291							
	Nisine A (480)	Pediocin PA-1 (>500)	Nisine A + Pediocin PA-1 (>500 />500)	B1 (>500)	B2 (>500)	C1 (1000)	C2 (1000)	C1+C2 (7,81/7,81)
Ampicilline (>80)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Amoxicilline (>200)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Céfaclor (>240)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Ciprofloxacine (>40)	>500 + >5	>500 + >5	250 + 250 + 1.25	> 500 + > 10	ND	250 + 0,62	500 + 1,25	62,5 + 62,5 + 0,62
Cefixime (>40)	> 500 + > 5	> 500 + > 5	> 250 + > 250 + > 5	ND	ND	ND	ND	ND
Cefotaxime (>240)	> 500 + > 30	> 500 + > 30	> 250 + > 250 + > 30	ND	ND	ND	ND	ND
Gentamycine (60)	125 + 3.75	500 + 15,00	62.5 + 62.5 + 3.75	125 + 7,50	ND	250 + 7,5	ND	ND
Pénicilline G (>53)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN

ND : Non Déterminé ; RN : Résistance Naturelle. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la CMI individuelle de chaque agent antibactérien vis-à-vis de la souche testée. Les cases colorées montrent les résultats positifs obtenus pour l'ensemble des combinaisons testées.

NB : la CMI de la bactériocine est indiquée en premier, celle de l'antibiotique est en deuxième position.

Tableau 40. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis à vis de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* 230173 multi-résistante aux antibiotiques

Bactériocine + antibiotique ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 230173							
	Nisine A (>500)	Pediocin PA-1 (500)	Nisine A + Pediocin PA-1 (>500/ >500)	B1 (>500)	B2 (>500)	C1 (>1000)	C2 (>1000)	C1+C2 (250/ 250)
Ampicilline (>80)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Amoxicilline (>200)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Céfactor (>240)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Ciprofloxacine (0,23)	S	S	S	S : TP (125 + 2,5)	S	S : TP (500 + 1,25)	S : TP (125 + 0,31)	S : TP (31,25 + 31,25 + 0,62)
Cefixime (>40)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Cefotaxime (>240)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN
Gentamycine (3,75)	S	S	S	S : TP (62,5 + 3,75)	S	S : TP (125 + 3,75)	S	S
Pénicilline G (>53)	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN	RN

S : Sensible ; RN : Résistance Naturelle ; TP : Témoin Positif. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la CMI individuelle de chaque agent antibactérien vis-à-vis de la souche testée.

NB : la CMI de la bactériocine est indiquée en premier, celle de l'antibiotique est en deuxième position.

Tableau 41. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis-à-vis de la souche de *Staphylococcus aureus* 400037 multi-résistante aux antibiotiques

Bactériocine + antibiotique ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	<i>Staphylococcus aureus</i> 400037							
	Nisine A (=125)	Pediocin PA-1 (>500)	Nisine A + Pediocin PA-1 (=15,62/15,62)	B1 (> 500)	B2 (> 500)	C1 (=250)	C2 (=250)	C1+C2 (=62,50 / 62,50)
Ampicilline (>80)	62.5 + 0.31	>500 + >10	> 250 + > 250 + > 10	> 500 + > 20	> 500 + > 20	125+ 0,62	125+ 0,62	31,25+31,25+ 0,31
Amoxicilline (>200)	62.5 + 0.78	250 + 25	> 250 + > 250 + > 25	> 500 + > 50	>500 + > 50	125 + 1,56	125+ 1,56	31,25+31,25+1,56
Céfaclor (>240)	125 + 3.75	500 + 30	> 250 + > 250 + > 30	125 + 15	>500 + > 60	62,5 + 0,93	125+ 1,87	62,5+ 62,5 + 3,75
Ciprofloxacine (>40)	62.5+ 0.62	62.5 + 0.62	> 250 + > 250 + > 5	31,25 + 0,31	> 500 + > 10	125+ 0,62	62,5+0,62	62,5 + 62,5 + 0,62
Cefixime	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cefotaxime (4)	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamycine (0,9)	S	S	S	S	S	S	S	S
Pénicilline G (>53)	62.5 + 0.19	>500 + >6,25	> 250 + > 250 + > 6,25	> 500 + > 12,5	125 + 41,66	125 + 6,66	125+ 3,33	31,25+31,25+ 3,33

NA : Non Applicable ; S : Sensible. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la CMI individuelle de chaque agent antibactérien vis-à-vis de la souche testée. Les cases colorées montrent les résultats positifs obtenus pour l'ensemble des combinaisons testées.

NB : la CMI de la bactériocine est indiquée en premier, celle de l'antibiotique est en deuxième position.

Tableau 42. CMI de la combinaison antibiotique/bactériocine vis-à-vis de la souche d'*Enterococcus faecalis* 300043 multi-résistante aux antibiotiques

Bactériocine + antibiotique (µg.ml ⁻¹)	<i>Enterococcus faecalis</i> 300043							
	Nisine A (125)	Pediocin PA-1 (>0,49)	Nisine A + Pediocin PA-1 (0,12/ 0,12)	B1 (500)	B2 (>500)	C1 (>125)	C2 (62,5)	C1+C2 (7,81/ 7,81)
Ampicilline (5)	S	S	S	S : TP (62,5 + 2,5)	S	S : TP (62,5+ 1,25)	S : TP (62,5 + 0,62)	S : TP (31,25 + 31,25 + 0,31)
Amoxicilline (6,25)	S	S	S	S : TP (62,5 + 1,56)	S : TP (62,5 + 6,25)	S : TP (125 + 3,12)	S : TP (62,5 + 0,78)	S : TP (31,25 + 31,25 + 0,78)
Céfaclor (>240)	62,5 + 3,75	4,87 .10 ⁻¹ + 7,3. 10 ⁻³	3,9 + 3,9 + 1,17.10 ⁻¹	> 500 + > 60	> 500 + > 60	62,5 + 3,75	62,5 + 1,87	31,25 + 31,25 + 1,87
Ciprofloxacine (1,25)	S	S	S	S	S	S	S	S : TP (31,25 + 31,25 + 0,15)
Cefixime (>40)	RN 125 + 0,31	RN 2,43 .10 ⁻¹ + 2,44.10 ⁻³	RN 3,9 + 3,9 + 1,95.10 ⁻²	RN > 500 + > 10	RN	RN 62,5 + 0,62	RN	RN
Cefotaxime (>240)	RN 62,5 + 3,75	RN 2,43 .10 ⁻¹ + 3,59.10 ⁻³	RN 3,9 + 3,9 + 1,17.10 ⁻¹	RN 125 + 15	RN	RN 62,5 + 3,75	RN	RN
Gentamycine (30)	I	I	I	I	I	I	I	I
Pénicilline G (>53)	62,5 + 0,78	9,75 .10 ⁻¹ + 2,96.10 ⁻³	3,9 + 3,9 + 0,024	125 + 6,25	500 + 13,33	125 + 3,33	62,5 + 1,66	15,6 + 15,6 + 1,66

S : Sensible ; TP : Témoin Positif ; RN : Résistance Naturelle ; ND : Non Déterminé. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la CMI individuelle de chaque agent antibactérien vis-à-vis de la souche testée. Les cases en rose montrent les résultats positifs obtenus pour l'ensemble des combinaisons testées.

Les cases en vert montrent des résultats positifs obtenus par des antibiotiques vis-à-vis desquelles la souche est naturellement résistante.

NB : la CMI de la bactériocine est indiquée en premier, celle de l'antibiotique est en deuxième position.

DISCUSSION

I. Les bactériocines des bactéries lactiques

Dans cette étude, 71 isolats de bactéries lactiques ont été sélectionnés à partir de 215 isolats bactériens obtenus de divers produits alimentaires fermentés. Parmi ceux-ci, une majorité a montré une activité antibactérienne, mais seuls 22 isolats avaient une activité notable et reproductible qui pouvait être probablement due à une production de bactériocines. Nous en avons retenus 5 qui ont fait l'objet d'une purification et d'une identification des molécules à l'origine de l'activité : 3 souches d'*Enterococcus durans* (LV4, LC2 et JP1) isolées à partir du lait de vache, lait de chamelle et jus de pastèque naturel respectivement et deux souches de *Lactococcus lactis* (EO24 et LV120) isolées à partir de la saumure d'olives et du lait de vache. En plus de celles-ci, deux autres souches (*Lactobacillus plantarum* L3 et *Lactococcus lactis* L17) préalablement isolées au laboratoire ont été intégrées à cette étude. Au Maroc, la production de bactériocines par des bactéries lactiques issues de différents produits du terroir a été déjà rapportée par plusieurs auteurs. Néanmoins, rares sont ceux qui ont pu isoler et purifier les bactériocines responsables de l'activité antibactérienne (Khaoua *et al.*, 1997; Achemchem *et al.*, 2004; 2005; 2014 ; Hammi *et al.*, 2016 ; 2019).

II. Optimisation de la production des bactériocines

En présence d'extrait de levure, les deux souches *Lactococcus lactis* L17 et *Enterococcus durans* LC2 ont montré une augmentation (de 2% et 3% respectivement) de l'activité antibactérienne observée, indirectement indicatrice de la quantité de bactériocine produite. Par contre, l'effet maximal observé pour *Lactococcus lactis* EO24 et *Lactobacillus plantarum* L3 l'était en absence d'extrait de levure. Cette variation de l'effet de l'extrait de levure sur la production de bactériocine a déjà été rapportée. En effet, Mollendorff *et al.* (2009) ont indiqué que la présence de l'extrait de levure dans le milieu de culture permettait une production optimale de bactériocines par des souches de *Lactobacillus*. De même, Lim *et al.* (2010) ont montré que la souche *Lactobacillus plantarum* KC21 avait une production maximale en présence de 0,5% d'extrait de levure. Par contre, Mataragas *et al.* (2003) n'ont observé aucune influence de l'extrait de levure sur la production de la bactériocine produite par *Lactobacillus curvatus* L442. Concernant l'effet du pH, la production optimale a été obtenue à pH 7,0 pour *Lactobacillus plantarum* L3, à pH 7,5 pour *Lactococcus lactis* L17 et à pH 8,0 pour *Lactococcus lactis* EO24 et *Enterococcus durans* LC2.

Pour toutes les souches retenues, l'activité antibactérienne maximale mesurée dans l'extrait de culture l'a été lorsque les bactéries ont été cultivées à 37°C. Aucune activité n'a été détectée pour quatre souches sur les sept testées à 40°C, ce qui suggère une production trop faible pour être détectée ou une dégradation des bactériocines produites à des températures élevées. D'ailleurs, les travaux de Tomas *et al.* (2002) ont montré que les cellules de *Lactobacillus salivarius* CRL128 étaient incapables de synthétiser les bactériocines à 44°C. De même, Messens *et al.* (2003) ont rapporté que la production de la curvacine A par la souche *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 a été totalement inhibée à partir d'une incubation à 38°C.

L'ensemble de ces résultats montrent, que chaque souche peut répondre différemment aux conditions expérimentales de culture pour la production des bactériocines.

III. Purification des bactériocines

La purification des bactériocines produites a montré que les deux souches *Enterococcus durans* LC2 et *Lactococcus lactis* EO24 étaient des multi-producteurs de bactériocines alors que, les deux souches *Lactococcus lactis* L17 et *Lactobacillus plantarum* L3 étaient des mono-producteurs. Etant donné que les bactériocines peuvent avoir des spectres d'activité très différents, le choix de la souche indicatrice est déterminant. Dans ce travail, les deux souches indicatrices retenues ont été choisies de manière à détecter l'ensemble des bactériocines présentes dans l'extrait de culture bactérien au cours des étapes de purification. Au total, sept bactériocines ont été purifiées et identifiées à partir de quatre souches bactériennes.

1. Protocole de purification

Dans notre travail, les deux premières étapes du protocole classique de purification des bactériocines (précipitation au sulfate d'ammonium et dessalage) n'ont pas été effectuées, sauf dans le cas de la souche *Lactococcus lactis* EO24. En effet, le surnageant obtenu après centrifugation de la culture a été passé directement sur l'échangeur de cations après ajustement du pH. En plus du gain de temps, ceci présente l'avantage d'éviter les pertes lors de l'étape de précipitation. Pour les quatre souches, la totalité de l'activité mesurée dans l'extrait de culture a pu être retenue sur la colonne échangeuse de cations. Cette optimisation a été également rapportée par Izquierdo *et al.* (2008).

Par ailleurs, pour la première fois, nous avons utilisé dans ce travail une chromatographie en phase inverse sur une colonne **phényl hexyl** au lieu de la colonne C18 généralement adoptée. La résolution que nous avons pu obtenir sur cette colonne a permis de réduire le nombre de

passages nécessaires pour obtenir la bactériocine pure. En effet, dans la plupart des études réalisées (Cintas *et al.*, 2000 ; Izquierdo *et al.*, 2008 ; Basanta *et al.*, 2009 ; Hammi *et al.*, 2016, 2018), la purification des bactériocines nécessite plusieurs passages successifs sur la colonne C18. Ce qui constitue une perte de temps, dans la mesure où il faut en moyenne cinq à six passages de 30 min chacun, alors que, deux passages de 15 min chacun sont suffisants en utilisant la colonne phényl hexyl. Par ailleurs, la quantité d'acétonitrile utilisée dans ce cas est réduite d'au moins de moitié.

2. Souches multi-productrices de bactériocines

a. La souche *Enterococcus durans* LC2

La purification de l'extrait de culture de la souche *Enterococcus durans* LC2, a montré que cette dernière produisait cinq peptides antimicrobiens (A, B1, B2, C1 et C2). Mis à part le peptide A, ces peptides ont été purifiés ce qui a permis d'identifier B1 et C1 comme étant l'enterocine L50A et B2 et C2 comme étant l'entérocin L50B avec néanmoins des différences notables particulièrement pour les peptides C1 et C2.

Généralement, les entérocin L50A et L50B sont produites par le genre *Enterococcus*, et plus précisément par des souches d'*Enterococcus faecium* (Franz *et al.*, 1999 ; Egan *et al.*, 2016) isolées à partir de différentes sources alimentaires comme les saucisses espagnoles séchées fermentées (Cintas *et al.*, 1995), le fromage marocain à pâte molle (Achemchem *et al.*, 2005), le fourrage d'ivraie (Izquierdo *et al.*, 2008). A notre connaissance, seule la souche *Enterococcus durans* 61A, isolée à partir d'un produit laitier traditionnel fermenté, a montré la production simultanée des deux entérocin L50A et L50B sous deux formes ; une formylée et une autre non formylée (Hanchi *et al.*, 2016). En effet, selon différentes études, les espèces d'*Enterococcus durans* sont connues pour produire d'autres types de bactériocines. Ainsi, Yanagida *et al.*, (2005) ont montré que la souche *Enterococcus durans* L28-1 produisait deux peptides de la bactériocine (durancin L28-1A) de masses moléculaires de 3,4 KDa et 2,5 KDa. De même, Batdorj *et al.*, (2006) ont rapporté qu'une souche d'*Enterococcus durans* produisait l'entérocin A5-11A et l'entérocin A5-11B. Hammi *et al.*, (2016) ont également montré que la souche *Enterococcus durans* A4 produisait la pédiocine PA-1 et l'enterocine P et que la souche *Enterococcus durans* T4 produisait la pédiocine PA-1, l'enterocine A et l'entérocin AS-48.

L'entérocin L50 est une bactériocine appartenant à la classe IIb, décrite pour la première fois en 1998 par Cintas *et al.* (1998). Elle a été isolée à partir de la souche *Enterococcus faecium*

L50. Il s'agit d'une bactériocine sans peptide leader à deux peptides dont l'activité est synergique (Cintas *et al.*, 1998).

Dans notre étude, les deux peptides B1 et B2 identifiés, présentent une différence de masse par rapport à la masse des entérocinés L50A et L50B non modifiées (**Tableau 43**). Cette différence peut être due probablement à des modifications biochimiques (formylation, oxydation, méthylation...) qui peuvent se produire pendant la biosynthèse de cette bactériocine, comme cela a été suggéré par Izquierdo *et al.*, (2008).

Tableau 43. Récapitulatif des masses des bactériocines B1, B2, C1 et C2 obtenues

	Masse théorique	Masse expérimentale	
		Bactériocine B1 et B2	Bactériocine C1 et C2
L50A	5190,37 Da	5231,82 Da \longrightarrow B1 (+ 41,45 Da)	4471,44 Da \longrightarrow C1 (-718,93 Da)
L50B	5178,28 Da	5219,85 Da \longrightarrow B2 (+ 41,57 Da)	4460,94 Da \longrightarrow C2 (-717,34 Da)

La traduction des séquences nucléotidiques obtenues, a montré que la séquence du peptide B1 est identique à celle de l'entérociné L50A. Par contre, la séquence du peptide B2 diffère de celle de l'entérociné L50B au niveau de l'acide aminés 36 où l'asparagine a remplacé par l'isoleucine. Par ailleurs, les séquences peptidiques obtenues des bactériocines C1 et C2 suggèrent qu'il s'agit probablement de fragment actifs des entérocinés L50A et L50B.

Ainsi, il apparaît que, l'identification des bactériocines B2, C1 et C2 reste incertaine, un nouveau séquençage nucléotidique s'avère nécessaire.

Les entérocinés L50A et L50B sont assez répandues dans la nature (Franz *et al.*, 1999). Cependant, leurs masses mesurées sont souvent différentes des masses calculées (Achemchem *et al.*, 2005 ; Izquierdo *et al.*, 2008). En effet, de nombreuses études ont rapporté les masses uniquement de leurs formes modifiées (Moreno *et al.*, 2002 ; Achemchem *et al.*, 2005). Néanmoins, plus récemment, Hanchi *et al.*, (2016) ont pu isoler et purifier les entérocinés L50A et L50B sous leur forme non modifiée.

Dans cette étude, deux formes modifiées des entérocinés L50A et L50B ont été obtenues. La première forme (B1 et B2) avec une différence de 41,45 Da et 41,57 Da respectivement. La deuxième forme (C1 et C2), nouvelle forme, jusque-là non décrite, qui se traduit par une masse

moléculaire significativement plus faible que la masse mesurée des bactériocines B1 et B2 (-760Da).

b. La souche *Lactococcus lactis* EO24

Un autre multi-producteur est la souche *Lactococcus lactis* EO24, isolée à partir de la saumure d'olives et productrice de trois peptides antibactériens (A, B et C), dont seul le peptide C a pu être purifié et sa masse déterminée : 5214,9 Da. Celui-ci est toujours en cours d'identification.

Ainsi, les deux souches *Enterococcus durans* LC2 et *Lactococcus lactis* EO24 sont multi-productrices de bactériocines. Ceci est en accord avec plusieurs données de la littérature, qui ont montré l'aptitude de ces deux espèces de bactéries lactiques à produire plus d'une bactériocine (Jimeñez-Díaz *et al.*, 1993 ; Quadri *et al.*, 1994 ; Nes *et al.*, 1996 ; Casaus *et al.*, 1997 ; Izquierdo *et al.*, 2008 ; Sawa *et al.*, 2011 ; Hammi *et al.*, 2016).

3. Souches mono-productrices de bactériocines

c. La souche *Lactococcus lactis* L17

Les souches de *Lactococcus lactis* sont connues pour être des producteurs de nisine, depuis que cette dernière a été découverte par Rogers (Rogers, 1928 ; Wessels et Huss, 1996 ; Parada *et al.*, 2007). Dans ce travail, la nisine Z a été obtenue à partir de l'extrait de culture de la souche *Lactococcus lactis* L17.

Cette bactériocine est le seul lantibiotique à posséder le statut GRAS (Generally Recognized As Safe), décerné en 1988 par la FDA (Food and Drug Administration), et donc le seul à être utilisé en tant que conservateur (E 234), notamment, dans les produits laitiers et fermentés. C'est un peptide de 34 acides aminés, de la classe Ia, il contient des acides aminés inhabituels tels que la lanthionine, la déhydroalanine et la 3-méthyllanthionine résultant d'un processus de modification post-traductionnelle (Wirawan *et al.*, 2006). À ce jour, différentes variantes naturelles de la nisine ont été rapportées dans la littérature, il s'agit de la nisine A, Z, Q, U, U2 et F, dont les structures diffèrent par un ou plusieurs acides aminés. La nisine A et la nisine Z étaient les premières variantes à avoir été caractérisées (Rollema *et al.*, 1996 ; Meghrouh *et al.*, 1997) suivies par la nisine U et la nisine Q, découvertes plus tard (Broütz et Sahl, 2000 ; Zendo *et al.*, 2003).

La nisine fait partie des bactériocines les plus étudiées en raison de sa forte activité vis-à-vis d'une large gamme de bactéries pathogènes alimentaires (Willey *et al.*, 2007 ; Fernandez, 2014). Plusieurs études ont montré que la nisine agit contre la cellule cible en se liant au lipide II, permettant ainsi la formation de pores à la surface cellulaire et provoquant par ailleurs l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire et donc la mort de la cellule cible (Breukink *et al.*, 2006 ; Breukink *et al.*, 2003 ; Christ, *et al.*, 2007 ; Martin, 2007).

d. La souche *Lactobacillus plantarum* L3

L'espèce *Lactobacillus plantarum* est répandue dans la nature et est utilisée dans la fermentation de nombreux produits alimentaires, notamment les produits végétaux (Verellen *et al.*, 1998). Une étude réalisée par Reenen *et al.*, (1998 ; 2003) a montré que la souche *Lactobacillus plantarum* 423 produisait l'entéroisine AS-48 et la plantaricine 423. Le même résultat a été rapporté par Hammi *et al.*, (2016) concernant la souche *Lactobacillus plantarum* MJP1. Dans notre étude, la purification de l'extrait de culture de la souche *Lactobacillus plantarum* L3, a montré que cette souche produisait la pédiocine PA-1. Il s'agit d'une bactériocine de 44 acides aminés appartenant à la classe IIa (Van Belkum *et al.*, 1991 ; Chikindas *et al.*, 1993). Sa masse moléculaire mesurée est de 4621 Da, soit la même masse que celle rapportée par Henderson *et al.*, (1992) et Ennahar *et al.*, (1996). La pédiocine PA-1 possède une activité antimicrobienne à spectre relativement étroit vis-à-vis de bactéries Gram positif, y compris des pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* (Ennahar *et al.*, 2000) responsable de nombreuses toxi-infections alimentaires et de taux élevés de mortalité en Europe occidentale et en Amérique du Nord notamment (Muriana, 1996). Elle fait partie des bactériocines les plus étudiées depuis plus d'une vingtaine d'années, comme en témoigne les nombreuses publications s'y référant (Henderson *et al.*, 1992; Chikindas *et al.*, 1993; Ennahar *et al.*, 1996 ; Rodriguez *et al.*, 2002; Naghmouchi *et al.*, 2008).

IV. Activité antibactérienne des bactériocines

1. Activité vis-à-vis des pathogènes alimentaires

Des souches pathogènes d'origine alimentaire ont été utilisées pour tester l'activité antibactérienne des peptides purifiés B1 (entéroisine L50A) et B2 (entéroisine L50B). Il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, certaines souches d'*Enterococcus spp* et de *Listeria monocytogenes*. Ces pathogènes, responsables de la détérioration des aliments, sont à l'origine de diverses toxi-infections en raison de la gravité et/ou de la fréquence

des risques qu'ils présentent. D'une manière générale, leur présence dans les aliments, se manifeste par l'élaboration de diverses substances, notamment des toxines dont l'ingestion présente un risque sérieux pour la santé du consommateur (Semasaka, 1986). Ainsi, dans le cas de *Listeria monocytogenes*, les infections restent toujours associées à un fort taux de mortalité (20–30 %) et de séquelles, notamment dans les cas d'infections du système nerveux central (Goulet, 2004 ; Mylonakis, 1998). Dans tous les cas, la contamination des aliments par ces différents pathogènes, peut être causée par l'inefficacité des traitements technologiques subis, par une contamination croisée par l'intermédiaire du personnel, par l'eau ou par les équipements et les installations utilisés.

Dans ce travail, les résultats obtenus vis-à-vis des pathogènes alimentaires testés ont montré que le peptide B1 (L50A) était actif à des CMI variant de 500 à 15,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vis-à-vis de la majorité des souches testées, sauf dans le cas de *Salmonella enteritidis* S1 où aucune activité n'a été observée même à la concentration de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Par contre, le peptide B2 (L50B) était moins actif avec globalement des CMI plus élevées que celles obtenues avec B1, notamment, vis-à-vis d'*Enterococcus faecium* E10, de *Staphylococcus xylosus* S8 et de *Listeria monocytogene* 3b L37. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Cintas *et al.*, (1998) où l'activité antibactérienne de l'entéroïne L50A était plus élevée que celle de l'entéroïne L50B.

Par ailleurs, la combinaison des deux entéroïnes L50A et L50B (B1+B2) a montré une activité synergique significative, avec des CMI très faibles, généralement de l'ordre de 15,65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par certains auteurs (Cintas *et al.*, 1995 ; Cintas *et al.*, 1998 ; Izquierdo *et al.*, 2008), qui ont décrit un effet synergique marqué entre les deux entéroïnes.

Dans le cas particulier de la souche *Salmonella enteritidis* S1, aucune sensibilité n'a été observée vis-à-vis des peptides B1 et B2 seuls ou en combinaison. Dans la mesure où il s'agit d'une bactérie Gram-, on peut supposer que ce résultat est lié à la présence de la membrane externe qui empêche les bactériocines d'atteindre leur siège d'activité, comme cela a été rapportée par plusieurs études auparavant (Todorov *et al.*, 2005 ; Ananou *et al.*, 2005, Shelburne *et al.*, 2007).

La plupart des bactéries lactiques ont le statut GRAS et peuvent être utilisées en toute sécurité dans les différentes applications alimentaires (EFSA, 2007). Bien que les entérocoques en font partie, ils sont considérés comme des porteurs potentiels de facteurs de virulence

(Moreno *et al.*, 2006). C'est notamment le cas d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*, raison pour laquelle ces deux espèces, même lorsqu'elles sont productrices de bactériocines, ne peuvent être utilisées *in situ* dans les matrices alimentaires. Dans ce travail, nous avons montré que les entérocinines L50A et L50B (B1 et B2) sont produites par la souche *Enterococcus durans* LC2. Or, cette espèce ne semble pas posséder de gène de virulence comme cela a été décrit dans les travaux de Hanchi *et al.*, (2016) et figure parmi les bactéries lactiques ayant le statut GRAS (Batdorj *et al.*, 2006). Ceci ouvre la voie à son éventuelle utilisation *in situ* comme agent antimicrobien au cours de la conservation de différents produits alimentaires comme cela a été suggéré par Yanagida *et al.*, (2005) ; Batdorj *et al.*, (2006) et par Hu *et al.*, (2008).

Une autre possibilité d'utilisation des entérocinines dans les aliments afin d'empêcher et/ou de réduire le développement des pathogènes est de les introduire dans la matrice alimentaire sous leur forme purifiée ou semi purifiée. Ainsi, Ribeiro *et al.*, (2017) ont rapporté l'efficacité de l'entérocinine AS-48 semi-purifiée à partir d'une souche d'*Enterococcus faecalis* dans la réduction de la contamination par *Listeria monocytogenes* dans un fromage frais. De même, Egan *et al.*, (2016) ont suggéré que l'utilisation la plus appropriée des entérocinines dans le domaine alimentaire était leur incorporation dans l'aliment sous leur forme purifiée.

2. Acticité vis-à-vis des pathogènes humains

a. La résistance aux antibiotiques

Le nombre des infections dues aux bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Gram+ et Gram-) augmente à un rythme alarmant de par le monde (Carlet *et al.*, 2012 ; Ovchinnikov *et al.*, 2016). Notre enquête sur plus de mille échantillons cliniques a montré une prévalence élevée (68,4%) de souches multi-résistantes parmi les isolats récoltés. Elle a également montré que les BMRe se trouvaient majoritairement dans les urines (72%), ce qui a déjà été rapportée par d'autres auteurs. En effet, d'après Anglaret et Mortier (2002) et différents rapports de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF, 2014), les infections urinaires représentent la première cause de maladies nosocomiales (entre 40 et 50%). De même, Wazieres et Rainfray (2009) ont rapporté que les infections urinaires étaient le second motif des consultations d'urgence et des prescriptions d'antibiotiques juste après les infections respiratoires. Il est à noter que cette infection se traduit par la présence de germes dans les urines et se manifeste le plus souvent par des douleurs ou une sensation de brûlure lors de l'émission de l'urine, et parfois par des douleurs abdominales et de la fièvre.

Dans ce travail, il a été également montré que les infections touchaient majoritairement les personnes âgées au-delà de 59 ans (prévalence de 60%), suivies par les adultes ayant entre 19 et 59 ans (27%) et finalement, les enfants et les nouveaux nés avec une prévalence de 10% et 3% dans chaque catégorie. Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté par Mrich *et al.*, (2018) où 59 % des patients ayant contracté des infections urinaires dues aux BMRe était des personnes âgées de plus de 59 ans, suivies par les adultes avec un taux de 41%. Cette forte prévalence chez les personnes âgées est probablement liée à une consommation plus importante d'antibiotiques chez cette catégorie de la population, amenant ainsi les bactéries à développer une résistance accrue vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

Par ailleurs, il ressort de nos résultats que, parmi l'ensemble des BMRe retenues, *Escherichia coli* est l'espèce la plus abondante (53%), suivie par *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus* spp avec une abondance de 10%. Viennent ensuite *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* avec 7% et *Salmonella* spp avec 3%. L'émergence de ces BMRe a été rapportée dans plusieurs études (Anglaret et Mortier, 2002 ; Benouda *et al.*, 2009 ; Figuigui *et al.*, 2013 ; Sedrati *et al.*, 2014 ; Mrich *et al.*, 2018). De plus, le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies (CEPCM, 2017), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ainsi que d'autres organismes internationaux ont ciblé ces germes comme étant les espèces bactériennes multi-résistantes isolées d'infections graves et les plus fréquemment recensées. La prévalence des BMRe dans cette étude comme dans plusieurs autres, met en évidence le niveau élevé et inquiétant atteint par l'antibio-résistance, ce qui représente un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Cette évolution alarmante conduit inévitablement à des échecs thérapeutiques, car elle remet en cause les traitements existants pour combattre les infections. La propagation rapide de la résistance aux antibiotiques a fait que la recherche pharmaceutique est aujourd'hui dans l'incapacité de développer de nouvelles molécules en nombre suffisant pour lutter contre toutes les souches mutantes.

Parallèlement aux mesures préventives préconisées par l'OMS et mises en place notamment en Europe, il est donc impératif de trouver des molécules alternatives ou complémentaires aux antibiotiques. Il s'agit donc d'identifier de nouveaux agents antimicrobiens, afin de les utiliser seuls ou en combinaison avec les antibiotiques. Dans ce sens, les différentes études, précédentes et actuelles, mettent en évidence le potentiel antimicrobien des bactériocines vis-à-vis des BMRe aux antibiotiques. Ceci peut constituer une alternative prometteuse à l'antibiothérapie traditionnelle.

Dans ce travail, sur les 30 BMRe retenues, les sept souches les plus résistantes ont été soumises à des antibiotiques purs, à des bactériocines purifiées et à la combinaison antibiotique/bactériocine. Comme nous l'avons signalé dans la présentation des résultats, et dans un souci de clarté, ne seront discutés que les résultats relatifs aux souches *Escherichia coli* 500097, *Acinetobacter baumannii* 280291 et *Staphylococcus aureus* 400037.

b. Activité antibactérienne des bactériocines seules et en combinaison avec les antibiotiques

Escherichia coli 500097 et *Acinetobacter baumannii* 280291 ont montré une résistance à l'ensemble des antibiotiques testés ; soit un taux de 100%, alors que ce taux était de 30,76% pour *Staphylococcus aureus* 400037. Dans les deux cas, il s'agit d'une résistance acquise, vu que ces trois espèces sont naturellement sensibles aux antibiotiques testés (Jehl *et al.*, 2019).

Dans cette étude, l'effet des bactériocines purifiées vis-à-vis des BMRe, ainsi que leurs effets potentialisateurs, voire synergiques avec l'activité des antibiotiques ont été étudiés. Ainsi, la sensibilité d'*Escherichia coli* 500097, d'*Acinetobacter baumannii* 280291 et de *Staphylococcus aureus* 400037 aux entérocoques purifiées L50A et L50B (peptides B1, B2, C1 et C2), à la nisine A, et à la pédiocine PA-1, seules ou en association avec divers antibiotiques a été testée.

Comme cela a été montré dans d'autres études, l'espèce la plus abondante dans la famille des entérobactéries est *Escherichia coli*, isolée majoritairement à partir des urines lors d'infections urinaires. La souche *Escherichia coli* 50097 retenue pour cette étude a montré une résistance accrue vis-à-vis des antibiotiques couramment utilisés contre l'espèce en question et qui appartiennent notamment aux aminoglycosides, aux pénicillines, aux céphalosporines et aux quinolones. Ce résultat confirme ceux rapportés par Mrich *et al.*, (2018) où l'ensemble des souches d'*Escherichia coli* isolées ont présenté un niveau de résistance très élevé vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines et des quinolones avec un taux variant de 50% à 92%. Des résultats similaires ont été obtenus au Maroc par des études réalisées aux CHUs de Rabat (Chakrani *et al.*, 2013) et de Fès (Chouaib *et al.*, 2007) et en France (rapports de Santé publique France (2016)).

Dans notre travail, l'étude de la sensibilité de la souche d'*Escherichia coli* 50097 aux extraits de culture d'*Enterococcus durans* LC2 et de *Lactococcus lactis* EO24 a montré un effet positif. En revanche, aucun effet n'a été observé vis-à-vis des bactériocines purifiées à partir de ces deux souches (**Tableau 35**). Ce résultat apparemment contradictoire, peut s'expliquer par

le fait que tous les peptides antimicrobiens issus de ces deux souches n'ont pas été purifiés, à savoir : le peptide A dans le cas de la souche *Enterococcus durans* LC2 et les peptides A et B dans le cas de la souche *Lactococcus lactis* EO24. Ainsi, l'effet positif observé pour l'extrait de culture de ces deux souches est probablement dû à une synergie d'activité entre l'ensemble des peptides produits par chacune des bactéries dans le milieu de culture.

Comme cité précédemment, la nisine et la pédiocine sont deux bactériocines largement étudiées dans le domaine alimentaire (Ennahar *et al.*, 2000 ; Drider & Rebuffat, 2011 ; Leikoski *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011). Néanmoins, depuis quelques années leur potentialité thérapeutique pour une application dans le domaine clinique et vétérinaire a été rapportée par plusieurs auteurs (Giacometti *et al.*, 2000 ; Bartoloni *et al.*, 2004 ; Naghmouchi *et al.*, 2013). Dans ce travail, une absence de sensibilité de la souche *Escherichia coli* 50097 a été observée vis-à-vis de la pédiocine PA-1 et de la nisine Z purifiées respectivement des souches *Lactobacillus plantarum* L17 et *Lactococcus lactis* L3, ainsi que vis-à-vis de la nisine A commerciale. Par ailleurs, aucune des combinaisons testées, que ce soit entre les bactériocines (B1+B2, C1+C2, nisine A+pédiocine PA-1) ou entre les deux familles d'antimicrobiens (bactériocine+antibiotique) n'a eu d'effet sur la résistance de cette souche. Ces résultats ne sont pas surprenants, dans la mesure où l'ensemble des études réalisées sur l'activité des bactériocines vis-à-vis de différentes souches d'*Escherichia coli* vont dans le même sens. Ainsi, Naghmouchi *et al.*, (2013) ont montré que la pédiocine PA-1/AcH et la nisine A n'avaient pas d'effet vis-à-vis de la souche *Escherichia coli* ATCC 35150 même à des concentrations de 200 µg.ml⁻¹. De même, plus récemment, Chi et Holo, (2018) ont montré que la souche *Escherichia coli* LMGT 3704 était insensible à la nisine et à la garvicin KS, seules ou en combinaison. En fait, les seuls résultats positifs obtenus vis-à-vis d'*Escherichia coli* le sont soit avec les colicines soit avec les microcines. Il s'agit de deux bactériocines produites par les espèces d'*Escherichia coli* et qui diffèrent par leurs masses moléculaires ; de 25 à 80 kDa pour les colicines et <10 kDa pour les les microcines (Budič *et al.*, 2011). Ainsi, Leavitt *et al.*, (1997) ont montré que la colicine V38 et la microcine C38 étaient actives vis-à-vis d'une large gamme de bactéries Gram⁻ dont *Escherichia coli*. De même, Budič *et al.*, (2011) ont rapporté l'effet positif de la colicine E7 vis-à-vis de 105 souches d'*Escherichia coli*. Plus récemment, Rendueles *et al.*, (2014) ont également rapporté que la colicine R affichait une activité accrue vis-à-vis d'un isolat clinique d'*Escherichia coli* LF82. Ceci est certainement lié au fait que l'activité des bactériocines des bactéries à Gram positif sur les bactéries à Gram négatif est empêchée par la présence de la membrane externe.

Les infections dues à *Acinetobacter baumannii* ont tendance à se produire chez les personnes immunodéprimées atteintes de maladies sous-jacentes graves, et chez les sujets traités avec des antibiotiques à large spectre (Garcia *et al.*, 2001). Elles se développent très fréquemment dans les unités de soins intensifs, où elles sont contractées lors de la ventilation associée à la pneumonie (PAV). *Acinetobacter baumannii* est également liée aux infections des voies urinaires, aux méningites et à la bactériémie (Appleman *et al.*, 2000). Selon l'OMS, *Acinetobacter baumannii* fait partie de la liste des « agents pathogènes prioritaires », pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques (classe des BMR « critique »). Elle appartient avec d'autres espèces du même genre, à la catégorie des bactéries à Gram négatif "naturellement transformables", à travers leur capacité naturelle à acquérir les gènes de la résistance aux antibiotiques. Ceci a rendu cette espèce normalement sensible, résistante à de nombreuses classes d'antibiotiques, notamment, les céphalosporines de 3^{ème} génération, les aminopénicillines et les aminosides (Liu *et al.* 2006 ; Fluckiger *et al.*, 1999 ; Rosenthal *et al.*, 2008). Nos résultats sont en accord avec ces données, dont la mesure où la souche *Acinetobacter baumannii* 280291 a montré une forte résistance vis-à-vis des 16 antibiotiques testés appartenant aux classes précitées, mais également aux classes des quinolones, des carbapénèmes, des tetracyclines et des sulfamides. Le seul cas de sensibilité a été observé pour la gentamycine, mais avec une CMI de 60 µg.ml⁻¹ largement au-dessus de la concentration critique (CC) recommandée par EUCAST (Jehl *et al.*, 2019).

Par ailleurs, la sensibilité de cette souche a été testée vis-à-vis de différentes bactériocines avant leur purification (extrait de culture) et après leur purification. Ainsi, la souche d'*Acinetobacter baumannii* 280291 a été sensible à l'extrait de culture de la souche *Enterococcus durans* LC2. Toutefois, cette sensibilité n'a pas été observée vis-à-vis des bactériocines purifiées B1 et B2, mais uniquement vis-à-vis de C1 et C2, avec un effet synergique très marqué en combinant les deux peptides C1+C2 (CMI de 7,81 µg.ml⁻¹ pour chaque peptide). Cette synergie est liée au fait que l'entérocyne L50 est une bactériocine à deux peptides dont les effets sont synergiques.

Aucun effet antibactérien positif des entérocyines L50A et L50B, sous leur forme native ou sous leur forme modifiée, n'a été rapporté auparavant vis-à-vis de bactéries à Gram négatif. C'est le cas des deux peptides antimicrobiens modifiés B1 et B2, obtenus dans cette étude. En revanche, c'est la première fois, à notre connaissance, qu'un effet positif des entérocyines L50A et L50B (C1 et C2) est mis en évidence vis-à-vis de bactéries à Gram négatif, et il s'agit d'une nouvelle forme modifiée des entérocyines L50A et B jamais décrite auparavant. Cette entérocyne

L50 appartient à la classe IIb, classe des bactériocines à deux peptides à action synergique, selon la classification de Alvarez-Sieiro *et al.*, (2016).

Généralement, les bactériocines issues des bactéries à Gram positif n'ont pas d'effet sur les bactéries à Gram négatif. Ceci s'explique par le fait que la membrane externe des Gram-empêche le passage des bactériocines qui ne peuvent donc pas atteindre leurs sièges d'activité, à savoir, la paroi et la membrane cytoplasmique. A notre connaissance, la seule bactériocine d'une bactérie à Gram positif décrite dans la littérature ayant une activité vis-à-vis des bactéries à Gram négatif est la garvicine KS. En effet, Chi et Holo (2018) ont montré que cette dernière était active vis-à-vis de deux souches : *Acinetobacter baumannii* B1162 et *Acinetobacter calcoaceticus* B1165. La garvicine KS est une nouvelle bactériocine, produite par *Lactococcus garviea* et découverte par Ovchinnikov *et al.*, (2016). Tout comme les entérocoques L50, la garvicine KS est également synthétisée sans peptide leader, et ne subit pas de modifications post-traductionnelles. Cependant, elle est composée de trois peptides et appartient à une nouvelle classe des bactériocines multi-peptidiques (Ovchinnikov *et al.*, 2016).

Bien que, le mécanisme d'action des peptides C1 et C2 ne soit pas connu, on peut néanmoins, émettre certaines hypothèses quant à leur activité contre *Acinetobacter baumannii* 280291. Cette activité antimicrobienne peut-être liée à un effet hémolytique des deux peptides C1 et C2, comme cela a été suggéré par Cintas *et al.* (1996) concernant l'activité des entérocoques L50A et L50B contre les bactéries à Gram+. En effet, ces deux bactériocines agiraient en formant des pores sélectifs dans la membrane comme c'est le cas des toxines sécrétées par les staphylocoques (Fitton *et al.*, 1980 ; Lee *et al.*, 1984). Une autre hypothèse serait la présence d'un récepteur "spécifique" aux deux bactériocines (C1 et C2) au niveau de la membrane externe de la souche d'*Acinetobacter baumannii* 280291. L'insertion de la bactériocine à ce niveau pourrait engendrer une rupture partielle de la membrane permettant ainsi à la bactériocine d'atteindre le peptidoglycane et/ou la membrane plasmique.

Une autre bactériocine, EO24/C purifiée à partir de la souche *Lactococcus lactis* EO24, a également été testée vis-à-vis de la souche *Acinetobacter baumannii* 280291. Mais, aucun effet n'a été obtenu alors même que l'extrait de culture était actif. Ceci peut s'expliquer par le fait que, tous les peptides antimicrobiens issus de cette souche n'ont pas été purifiés, à savoir les peptides A et B. Ainsi, l'effet positif observé pour l'extrait de culture de cette souche est probablement dû à une synergie d'activité entre les peptides produits par la bactérie.

D'autre part, l'effet antibactérien de la nisine A et de la pédiocine PA-1 a été également testé contre *Acinetobacter baumannii* 280291. Les résultats obtenus montrent une insensibilité vis-à-vis des deux bactériocines, seules ou en combinaison. Ces résultats sont en accord avec la plupart des données de la littérature, où aucune activité positive de la nisine et de la pédiocine n'a été rapportée vis-à-vis des bactéries Gram-. Hai Chi et Helge, (2018) ont par exemple montré que la nisine n'avait pas d'effet vis-à-vis de la souche *Acinetobacter baumannii* B1162. De même, Naghmouchi *et al*, (2013) ont montré que la nisine et la pédiocine étaient inefficaces vis-à-vis d'une gamme de bactéries à Gram- même à des concentrations de l'ordre de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La structure de la membrane externe des bactéries à Gram négatif ne permet en effet pas à la nisine et à la pédiocine d'atteindre la membrane cellulaire siège de leur activité (Ouweland et Vesterlund, 2004).

Cependant, la combinaison des deux familles d'antimicrobiens (bactériocine/antibiotique), a donné des résultats encourageants vis-à-vis de la souche *Acinetobacter baumannii* 280291. En effet, nous avons obtenu des effets positifs avec les combinaisons nisine + gentamycine, pédiocine PA-1 + gentamycine et nisine + pédiocine PA-1 + gentamycine, avec de très faibles valeurs de CMI de la gentamycine : de l'ordre de 3,75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Des résultats similaires ont été obtenus avec les bactériocines B1 et C1 issues de la souche *Enterococcus durans* LC2, avec des CMI de la gentamycine passant de 60 à 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans les deux cas. Les résultats des combinaisons nisine/gentamycine et nisine/gentamycine/pédiocine PA-1 sont prometteurs dans la mesure où la CMI obtenue pour la gentamycine, antibiotique de la classe des aminosides, ne dépasse pas celle recommandée par **EUCAST** (Jehl *et al.*, 2019), et qui est de 4mg/l. Dans le cas de la ciprofloxacine, antibiotique de la classe des quinolones, seule la combinaison des trois antimicrobiens (nisine A/pédiocine PA-1/ciprofloxacine) a montré un effet positif vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii* 280291. Par contre, concernant les bactériocines C1 et C2, l'effet positif a été observé aussi bien pour la combinaison C1/ciprofloxacine, C2/ciprofloxacine que pour la combinaison C1/C2/ciprofloxacine. Il est à noter que les valeurs de la CMI de la ciprofloxacine obtenues dans ces derniers cas sont très faibles. Ainsi, que ce soit pour la gentamycine ou pour la ciprofloxacine, on note que la souche *Acinetobacter baumannii* 280291 initialement résistante à ces deux antibiotiques même à des concentrations très élevées, y est devenue sensible en présence des bactériocines et avec des CMI de l'ordre de 0,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, notamment, dans le cas des bactériocines C1 et C2.

Néanmoins, la combinaison de la gentamycine avec la nisine ou avec la pédiocine PA-1 semble avoir fragilisé la membrane externe des bactéries à Gram négatif leur permettant ainsi l'accès à leur cible. La combinaison des trois antimicrobiens a amplifié ce phénomène. Dans le cas des bactériocines C1 et C2 issues de la souche *Enterococcus durans* LC2, comme suggéré plus haut, la fragilisation de la membrane externe d'*Acinetobacter baumannii* 280291 semble avoir eu lieu en absence de l'antibiotique. Cette fragilisation a certainement facilité l'accès de l'antibiotique à sa cible cellulaire, la sous unité (30S) du ribosome dans le cas de la classe des aminosides et l'ADN dans le cas de la classe des quinolones, et ceci à des CMI en dessous de la norme recommandée par EUCAST (Jehl *et al.*, 2019).

Par conséquent, l'ensemble des résultats obtenus vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii* 280291 montrent que la combinaison antibiotique/bactériocine peut être considérée comme une solution alternative en cas d'échec thérapeutique. Ainsi, l'effet potentialisateur des bactériocines vis-à-vis de divers antibiotiques auxquels *Acinetobacter baumannii* 280291 était initialement résistante, constitue une originalité dans ce travail. C'est en effet la première fois, à notre connaissance, que des bactériocines issues de bactéries lactiques (Gram+) - notamment la nouvelle forme décrite dans ce travail C1 et C2 - parviennent en combinaison avec certains antibiotiques à déjouer la résistance développée par cette espèce.

Staphylococcus aureus fait partie des espèces pathogènes les plus problématiques en raison de sa capacité à développer une résistance surtout dans les unités médicales et particulièrement vis-à-vis de la méticilline (SARM) (Giacometti *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2006). Ce qui fait que cette espèce est considérée comme l'une des principales espèces responsables des infections d'origine hospitalière (nosocomiale) et communautaire. L'antibiogramme réalisé pour la souche *Staphylococcus aureus* 400037 a révélé une résistance vis-à-vis des principales classes d'antibiotiques, les aminoglycosides, les céphalosporines, les pénicillines et les quinolones. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Boukhatem *et al.*, (2015) où les antibiogrammes réalisés pour des souches de *Staphylococcus aureus* ont montré une résistance élevée vis-à-vis de la classe des pénicillines et celle des aminoglycosides.

Par ailleurs, l'étude de la sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* 400037 vis-à-vis de l'ensemble des bactériocines purifiées a montré un effet antimicrobien positif des bactériocines C1 et C2 seules (250 µg.ml⁻¹ chacun), ainsi qu'un effet synergique très marqué en combinant les deux peptides C1+C2 (62,5/62,5 µg.ml⁻¹). Par contre, les deux peptides B1 et B2 n'ont pas eu d'effet sur la résistance de cette souche.

Quant à la bactériocine EO24/C purifiée à partir de la souche *Lactococcus lactis* EO24, aucun effet n'a été obtenu vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* 400037. Comme dans le cas d'*Acinetobacter baumannii* 280291, l'effet positif obtenu avec l'extrait de culture est probablement dû à une synergie d'activité entre les peptides produits par la bactérie dans le milieu de culture.

La souche *Staphylococcus aureus* 400037 a été sensible à la nisine A ($125 \mu\text{g.ml}^{-1}$), mais pas à la pédiocine PA-1, même à une concentration de $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Cela n'est pas surprenant, car l'activité des bactériocines est connue pour être spécifique à la souche. La pédiocine PA-1 est en fait efficace contre d'autres souches de *Staphylococcus aureus*, comme nous l'avons récemment démontré (Hammi *et al.*, 2019). Par ailleurs, la combinaison nisine A + pédiocine PA-1 nous a permis d'obtenir un effet synergique significatif avec une CMI de $15,6/15,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement. Ces résultats sont plus marquants que ceux obtenus par Hanchi *et al.*, (2017) où la CMI obtenue par la combinaison des deux bactériocines, vis-à-vis de souches de *Staphylococcus aureus*, était de $512 \mu\text{g.ml}^{-1}$. L'effet positif observé pour *Staphylococcus aureus* 400037, peut être attribué aux modes d'action différents des bactériocines des classes I et II. En fait, il a été démontré que les bactériocines de la classe I, telle que la nisine, avaient un double mode d'action. Elles peuvent se lier au lipide II, principal transporteur des sous-unités de peptidoglycane du cytoplasme vers la paroi cellulaire, empêchant ainsi la synthèse correcte de celle-ci, et entraînant par conséquent la mort de la cellule. Elles peuvent également utiliser le lipide II en tant que molécule d'amarrage pour initier un processus d'insertion dans la membrane et la formation de pores conduisant à une mort cellulaire rapide (Cotter *et al.*, 2005). D'autre part, les peptides de la classe IIa, ont une structure hélicoïdale amphiphile qui leur permet de s'insérer dans la membrane de la cellule cible, entraînant une dépolarisation et ainsi la mort cellulaire (Ennahar *et al.*, 2000). On peut donc suggérer que la pédiocine PA-1, inefficace contre la souche *Staphylococcus aureus* 400037 a bénéficié de l'altération initiale du peptidoglycane et/ou de la membrane plasmique provoquée par la nisine A afin de pouvoir agir à son tour.

Concernant les combinaisons bactériocines/antibiotiques, nous avons remarqué que celles des peptides B1 et B2 avec l'ensemble des antibiotiques testés, étaient inefficaces contre la souche *Staphylococcus aureus* 400037. Le seul effet positif obtenu est un effet synergique, en combinant les deux antimicrobiens : B1 et céfaclor ou B1 et ciprofloxacine. Dans ces deux cas, l'activité antimicrobienne pourrait être due à une fragilisation de la paroi et/ou de la membrane cellulaire à la suite d'interactions positives entre le peptide B1- l'antibiotique- la paroi et/ou la

membrane cellulaire. Ces interactions résulteraient de l'attraction électrostatique qui pourrait avoir lieu simultanément entre les charges de la bactériocine, de l'antibiotique et les charges de la paroi et/ou de la membrane plasmique, induisant ainsi un changement de la structure de ces derniers et permettant par la suite, l'accès des deux antimicrobiens à leurs sites d'activité. A l'inverse, une absence d'attraction électrostatique, dans le cas de la combinaison du peptide B1 avec les autres antibiotiques (l'ampicilline, l'amoxicilline et la pénicilline G) empêcherait l'insertion de l'un ou de l'autre des deux antimicrobiens au niveau de la paroi ou de la membrane, ne leur permettant pas ainsi d'atteindre leur siège d'activité, ce qui peut expliquer l'insensibilité observée par la souche *Staphylococcus aureus* 400037 vis-à-vis de ces combinaisons. Par ailleurs, l'absence de réponse positive à la suite de la combinaison du peptide B2 avec le céfaclor ou avec le ciprofloxacine, contrairement au peptide B1, est probablement liée au fait que ce dernier (L50A modifié) est connu pour être plus actif que B2 (L50B modifié), (entérocinés à deux peptides). Il est possible que, cette différence d'activité puisse être liée à la composition en acides aminés légèrement différente entre les deux peptides. En effet, selon le type des acides aminés présents dans la chaîne peptidique (polaire/apolaire) et leur emplacement, l'attraction électrostatique entre les différentes charges mises en jeu pourrait être différente, n'induisant pas le même changement de conformation de la structure et résultant donc en une activité différente voire en une absence d'activité.

D'autre part, un effet potentialisateur sur tous les antibiotiques testés a été observé en présence des bactériocines C1 et C2 seules ou en combinaison. On note même un effet synergique dans deux cas ; celui de la combinaison céfaclor/C1 et de la combinaison ciprofloxacine/C2. Etant donné que le mode d'action des entérocinés L50 n'est pas bien étudié, une des hypothèses les plus probables est que leur action consiste à rompre les cellules en formant des pores sélectifs pour les cations dans leur membrane plasmique comme c'est le cas des toxines sécrétées par les staphylocoques (Fitton *et al.*, 1980 ; Lee *et al.*, 1984). Ainsi, l'effet potentialisateur de ces deux bactériocines se traduirait par la formation de pores dans la membrane plasmique, permettant ainsi aux antibiotiques d'atteindre leur cible et donc de provoquer la mort cellulaire.

Concernant la combinaison nisine A/antibiotique, un effet potentialisateur de la nisine A a été observé, rendant ainsi la souche *Staphylococcus aureus* 400037 extrêmement sensible aux antibiotiques testés avec des valeurs de CMI comprises entre 0,19 et 3,75 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Des données similaires ont été obtenues par Tong *et al.*, (2014) contre des souches d'*Enterococcus faecalis* et par Field *et al.*, (2016) contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la

méticilline (SARM). L'effet de la nisine A sur l'activité des antibiotiques suggère qu'elle pourrait agir en premier en entravant la synthèse de la paroi ou en déstabilisant la membrane facilitant ainsi l'accès des antibiotiques à leurs objectifs. Ainsi, dans le cas du ciprofloxacine par exemple, l'action de la nisine a permis à cet antibiotique, appartenant à la classe des quinolones de franchir la membrane et d'inhiber la synthèse de l'ADN ainsi que les enzymes impliquées dans le maintien de sa structure (Hooper, 2001). Il en serait de même, pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline, qui appartiennent à la famille des β -lactamines et dont le mécanisme d'action consiste à inhiber la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (Tong *et al.*, 2014).

La combinaison de la pédiocine PA-1 avec l'amoxicilline, le ciprofloxacine et le céfador a permis l'apparition d'une sensibilité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* 400037 initialement résistante à ces deux antimicrobiens. L'apparition de cette sensibilité suggère qu'il y a une action simultanée de la pédiocine PA-1 et des antibiotiques pour l'altération de la membrane plasmique, et l'inhibition de la synthèse de l'ADN par le ciprofloxacine, ainsi que l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane par l'amoxicilline et le céfador. De ce fait, les mécanismes de réparation peuvent donc ne pas suffire à compenser tous les dommages causés par l'intervention des deux antimicrobiens, conduisant ainsi à la mort cellulaire.

Il est à noter qu'aucune activité n'a été observée à la suite de la combinaison des trois antimicrobiens : nisine A/pédiocine PA-1/antibiotique, et ceci quelque soit l'antibiotique testé, vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* 400037. Ce résultat est surprenant et paraît contradictoire. Il pourrait néanmoins s'expliquer par une éventuelle compétition entre les trois antimicrobiens au niveau des sites d'insertion, résultant alors en une saturation qui entraverait ainsi toute déstabilisation ou formation de pores au niveau de la membrane.

Il ressort de l'ensemble des résultats que nous venons de discuter, que l'activité antimicrobienne des peptides B1, B2 est différente de celle de C1, C2 bien qu'ils proviennent de la même souche productrice. En effet, l'activité antimicrobienne de C1 et C2, nouvelles formes modifiées des entérocinés L50A et L50B, décrites pour la première fois dans ce travail, est plus marquée par rapport à celle de B1 et B2, deuxième modifié obtenue dans cette étude. Cette différence existe aussi bien en présence des bactériocines seules qu'en combinaison qu'avec les antibiotiques. De plus, cette différence d'activité a été observée vis-à-vis des deux types de bactéries, Gram⁺ et Gram⁻, ce qui constitue une originalité des résultats obtenus dans ce travail par rapport à ceux déjà décrits par la littérature.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En réponse à une exposition prolongée et répétée aux antibiotiques, les bactéries à l'origine d'infections diverses développent des mutations et deviennent multi-résistantes. Il devient alors difficile, voire impossible, de les combattre avec les traitements disponibles. Ce phénomène, apparu dès les années soixante, constitue une grande menace pesant sur la santé des populations au niveau mondial. Certaines infections mortelles pour l'homme ayant été complètement éradiquées refont leur apparition en raison de l'inefficacité des antibiotiques classiques. La biorésistance constitue selon l'OMS et différentes organisations internationales et gouvernementales un des grands défis sanitaires du 21^{ème} siècle. Le rapport O'Neill (2016) chiffre à 10 millions le nombre de décès annuels liés à la résistance aux antibiotiques à l'horizon 2050. Pour lutter contre ce fléau, plusieurs programmes prioritaires de recherche ont été lancés de par le monde avec comme objectif de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi ces stratégies, il y a la recherche de nouveaux agents anti-infectieux à travers l'exploration de la biodiversité microbienne et notamment la valorisation des substances à potentiel antimicrobien secrétées par les bactéries lactiques, dont les bactériocines.

Il s'agit de peptides ayant un effet antimicrobien à spectre étroit et parfois large. Elles se distinguent des antibiotiques par leur production ribosomique et leur mode d'action. Elles possèdent des propriétés qui les placent comme substances sans danger pour l'homme du fait de leur sensibilité aux protéases du tube digestif et de l'absence de toxicité avérée. Toutes ces propriétés font des bactériocines une alternative ou un complément possibles aux antibiotiques.

Dans ce travail, nous nous sommes fixés comme objectifs de purifier et d'identifier de nouvelles bactériocines produites par des bactéries lactiques et de tester l'effet antimicrobien de l'ensemble des bactériocines purifiées vis-à-vis des BMRe issues de différents liquides biologiques humains. Pour cela, 7 bactéries productrices de bactériocines ont été sélectionnées et identifiées soit par spectrométrie de masse, soit par séquençage du gène de l'ARN 16S. Il s'agit de trois souches d'*Enterococcus durans* (LC2, LV4 et JP1), de trois souches de *Lactococcus lactis* (L17, EO24 et LV120) et de la souche *Lactobacillus plantarum* L3.

Le protocole de purification des bactériocines utilisé dans ce travail a été basé sur différentes techniques chromatographiques : chromatographie échangeuse de cations, chromatographie HPLC en phase inverse sur colonne semi-préparative C8, suivie d'une colonne analytique C18 puis d'une colonne phényl hexyl utilisée pour la première fois dans cette étude.

Les bactériocines purifiées ont été identifiées par la mesure de leurs masses par spectrométrie de masse ESI-TOF, certaines ont été identifiées par la caractérisation de leurs structures peptidiques à travers la technique de dégradation d'Edman et d'autres par un séquençage génétique par amplification de leurs gènes de structure. Parmi les sept souches bactériennes retenues, cinq étaient des multi-productrices de bactériocines, notamment la souche *Enterococcus durans* LC2, isolée du lait de chamelle marocain et la souche *Lactococcus lactis* EO24 isolée à partir de la saumure d'olives. Par ailleurs, deux souches étaient des mono-productrices de bactériocines, il s'agit de la souche *Lactococcus lactis* L17 isolée à partir d'ensilage et la souche *Lactobacillus plantarum* L3 isolée à partir du fromage Munster.

Ce travail nous a permis de purifier et d'identifier deux formes modifiées des entérocinines L50A et L50B produites par la souche *Enterococcus durans* LC2. Il s'agit des deux peptides B1 et B2 ayant une différence de masse de 41 Da par rapport à l'entérocinine L50 native, ainsi que deux fragments actifs de l'entérocinine L50A et L50B (C1 et C2) ayant des masses de 4471,44 Da et de 4460,94 Da, respectivement. Par ailleurs, à partir de l'extrait de culture de la souche *Lactococcus lactis* EO24 nous avons pu purifier un peptide (EO24/C) dont la masse est de 5214,90 Da et dont l'identification est toujours en cours. De plus, la pédiocine PA-1 et la nisine Z, ont été purifiées, respectivement à partir de *Lactobacillus plantarum* L3 et de *Lactococcus lactis* L17.

Les bactériocines purifiées ont montré une activité antimicrobienne marquée vis-à-vis des BMRe à Gram+ testées, telle que la souche *Staphylococcus aureus* 400037, mais également contre les bactéries à Gram- telle que la souche *Acinetobacter baumannii* 280291. De même, la combinaison bactériocine/antibiotique a permis d'augmenter la sensibilité des BMRe en potentialisant l'activité des antibiotiques ou en agissant en synergie avec eux. Ainsi, pour la première fois dans ce travail, nous avons mis en évidence l'activité des entérocinines L50A et L50B modifiées (B1 et B2) vis-à-vis des BMRe d'origine humaine. De plus, nous avons montré que deux fragments actifs de ces deux bactériocines (C1 et C2) avaient une activité plus importante que celle des bactériocines complètes B1 et B2. Par ailleurs, ces deux bactériocines L50A et L50B sous leurs deux formes B1 et B2, C1 et C2, seules ou en combinaison, ont montré une activité vis-à-vis de bactéries à Gram- bien qu'elles soient produites pas des bactéries à Gram+.

Ainsi, face à cette problématique de la biorésistance, une des solutions préconisées serait basée non sur l'utilisation d'une seule bactériocine mais sur l'élaboration d'un « mélange de

bactériocines » dont les modes d'action seraient différents. Comme semble le démontrer nos résultats, la probabilité qu'un mécanisme de multi-résistance ait lieu contre plusieurs bactériocines, ou contre une combinaison bactériocines/antibiotiques est bien plus faible que contre l'un des antimicrobiens seul. Par conséquent, les bactériocines peuvent être utilisées comme molécules de substitution ou en complément des antibiotiques.

D'autre part, l'utilisation d'une combinaison de bactériocines provenant d'une même souche multi-productrice est très intéressante dans la mesure où ces bactériocines, souvent complémentaires, sont moins concernées par le phénomène de résistance (Cintas *et al.*, 2000) que celles provenant des souches mono-productrices. En effet, la multi-production de bactériocines par une même souche est importante pour l'élargissement des spectres d'activité, pour l'augmentation de l'efficacité de l'inhibition ainsi que pour la complémentarité des effets antimicrobiens (Perez *et al.*, 2012). Ainsi, à titre d'exemple, l'utilisation *in situ* de souches de bactéries lactiques multi-productrices de bactériocines pourrait être envisagée au niveau de la flore intestinale pour combattre certaines infections bactériennes.

Les résultats obtenus dans ce travail, doivent être complétés par :

- ✓ La caractérisation des peptides B2, C1 et C2 par un nouveau séquençage nucléotidique, afin de confirmer l'identité des bactériocines purifiées ;
- ✓ La caractérisation du génome total de la souche *Enterococcus durans* LC2 par PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) afin de vérifier si les bactériocines B1, B2 et C1, C2 sont codées par un seul gène ou par deux gènes différents ;
- ✓ L'étude de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des bactériocines (classe IIb) produites par la souche *Enterococcus durans* LC2 avec la nisine Z (classe Ia) et/ou la pédicoline PA-1 (classe IIa) seules ou en combinaison avec des antibiotiques, afin d'élargir le spectre d'activité et d'évaluer leur capacité à déjouer la résistance bactérienne ;
- ✓ La purification et la caractérisation du peptide A produit par la souche *Enterococcus durans* LC2, ainsi que les deux peptides A et B produits par la souche *Lactococcus lactis* EO24 par d'autres techniques chromatographiques, notamment la chromatographie d'exclusion, électrophorèse capillaire ;

Par ailleurs l'ensemble des résultats de cette thèse ouvre les perspectives suivantes :

- ✓ L'étude de la relation structure-fonction pour l'ensemble des entérocinés L50 purifiées dans cette étude dont le mode d'action n'est pas clairement établi ;
- ✓ La caractérisation du génome total de la souche *Enterococcus durans* LC2 par PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) afin de vérifier l'absence de tout gène de virulence, pour une éventuelle application *in situ* ;
- ✓ L'étude de la cytométrie de fluorescence pour détecter les tests de viabilité (degré de mortalité cellulaire) ;
- ✓ L'étude de la pharmacocinétique des bactériocines purifiées ainsi que les tests de toxicité pour une éventuelle application chez l'Homme ;
- ✓ L'utilisation des bactériocines performantes sous forme de médicament enrobé afin d'éviter leur dégradation sous l'effet des protéases du tube digestif.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abee**, T, L Krockel, et C Hill. Bacteriocins: modes of action and potentials in food. (1995) *Int J Food Microbiol* 28: 169-185.
- Abts** A, Montalban-Lopez M, Kuipers OP, Smits SHJ, Schmitt L. Nis C binds the FxLx motif of the nisin leader peptide. (2013) *Biochemistry*: 52 (32), 5387–5395.
- Acar**, J. F., & Goldstein, F. W. Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents. (1998) *Clinical infectious diseases*. 27, S125-S130.
- Achemchem**, F, J Abrini, M Martinez-Bueno, E Valdivia, et M Maqueda. Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-Listeria produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. (2004) Marrakech: Congrès International de Biochimie.
- Achemchem**, F, M Martinez-Bueno, J Abrini, E Valdivia, et M Maqueda. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. (2005) *J Appl Microbiol* 99: 141–150.
- Achemchem**, F. Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre. (2014) Édité par C Morin. Presses Académiques Francophones.
- Achemchem**, F., M. Martinez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia, and M. Maqueda. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco.J. (2005). *Appl. Microbiol.* 99:141–150.
- Adams**, M.R, et P Marteau. On the safety of lactic acid bacteria from food. (1995) *Int J Food Microbiol* 27: 263-264.
- Aguirre**, M., & Collins, M. D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* (1993) 75(2), 95-107.
- Ait-Belgnaoui**, A., Han, W., Lamine, F., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., & Theodorou, V. *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. (2006) *Gut*, 55(8), 1090-1094.
- Allison**, G. E., Fremaux, C., & Klaenhammer, T. R. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. (1994) *Journal of bacteriology*, 176(8), 2235-2241.
- Almeida**, C., Sousa, J.M., Rocha, R., Cerqueira, L., Fanning, S., Azevedo, N.F., Vieira, M.J., Detection of *Escherichia coli* O157 using PNA-FISH: comparison to a standard culture method. (2013) *Applied and environmental microbiology*.
- Alvarez-Sieiro**, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. (2016) *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), 2939-2951.
- Ammor**, S, G Tauveron, E Dufour, and I Chevallier. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. (2006) *Food Control* 17: 454-468.
- Anand**, S.K, R.A Srinivasan, and L.M Rao. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-I. (1984) *Cult Dairy Prod J* 2: 6–7.
- Ananou**, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. (2005) *International Journal of Food Microbiology*, 103(2), 179-190.
- Anderssen**, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., & Nissen-Meyer, J. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(6), 2269-2272.
- Anglaret**. X et Mortier. E. Maladies infectieuses (3^eéd), Paris, De Boeck-Estem (2002) 292p.
- Appleman**, M. D., Belzberg, H., Citron, D. M., Heseltine, P. N., Yellin, A. E., Murray, J., & Berne, T. V. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. (2000) *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(4), 1035-1040.
- Archambaud**. M. (2009) Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse. P 23, 24, 33,34.
- Arnison** PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, Camarero JA, Campopiano DJ, Challis GL, Clardy J, Cotter PD, Craik DJ, Dawson M, Dittmann E, Donadio S, Dorrestein PC, Entian K-D, Fischbach MA, Garavelli JS, Göransson U, Gruber CW, Haft DH, Hemscheidt TK, Hertweck C, Hill C, Horswill AR, Jaspars M, Kelly WL, Klinman JP, Kuipers OP, Link AJ, Liu W, Marahiel MA, Mitchell DA, Moll GN, Moore BS, Müller R, Nair SK, Nes IF, Norris GE, Olivera BM, Onaka H, Patchett ML, Piel J, Reaney MJT, Rebuffat S, Ross RP, Sahl H-G, Schmidt EW, Selsted ME, Severinov K, Shen B, Sivonen K, Smith L, Stein T, Süßmuth RD, Tagg JR, Tang G-L, Truman AW, Vederas JC, Walsh CT, Walton JD, Wenzel SC, Willey JM, van der Donk WA. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature (2013) *Nat Prod Rep* 30:108–160.

- Aubert C**, Lojou E, Bianco P, Rousset M, Durand M-C, Bruschi M, Dolla A. The Desulfuromonas acetoxidans triheme cytochrome c7 produced in Desulfovibrio desulfuricans retains its metal reductase activity. (1998) *Appl Environ Microbiol* 64:1308-1312.
- Avnir, D.**, Braun, S., Lev, O., & Ottolenghi, M. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials (1994) *Chemistry of Materials* 6(10), 1605-1614.
- Axelsson, L.** Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects . (2004) 3e. Édité par S Salsinen, A.V Wright, & A. Ouwehand Vol. 633. New York, USA: Marcel Dekker.
- Babasaki, K.**, Takao, T., Shimonishi, Y. and Kurahashi, K. Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis*168: isolation, structural analysis, and biogenesis (1985) *Journal of Bio-chemistry* (Tokyo)98,585–603.
- Babic, M.**, Hujer, A. M., & Bonomo, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug resistance updates. (2006) 9(3), 142-156.
- Badis, A**, N Laouabdia-Sellami, D Guetarni, M Kihal, and R Ouzrout. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». (2005) *Sci. Technol* 23: 30-37.
- Barber, M.**, & Rozwadowska-Dowzenko, M. Infection by Penicillin-Resistant Staphyloecoci. (1948) *Lancet*, 641-4.
- Barinov, A.**, Bolotin, A., Langella, P., Maguin, E., & Van De Guchte, M. Genomics of the genus *Lactobacillus*. Lactic acid bacteria and bifidobacteria. (2011) *Current progress in advanced research* 1.
- Bartoloni A**, Mantella A, Goldstein BP, Dei R, Benedetti M, Sbaragli S, Paradisi F. In-vitro activity of nisin against clinical isolates of *Clostridium difficile* (2004) *J Chemother* 16:119–121
- Basanta, A.**, Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. (2009) *Appl. Environ. Microbiol* 75(8), 2382-2392.
- Batdorj, B.**, M. Dalgalarondo, Y. Choiset, J. Pedroche, F. Metro, H. Prevost, J. M. Chobert, and T. Haertle. Purification and characteriza-tion of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolianairag (2006) *J. Appl. Microbiol* 101:837–848.
- Bauer, R.**, Chikindas, M. L., & Dicks, L. M. T. Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 (2005) *International journal of food microbiology* 101(1), 17-27.
- Ben Omar N.**, Ampe F., Raimbault M., Guyot J.-P., Tailliez P., Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia) (2000) *Syst. Appl. Microbiol* 23 :285–291.
- Benkerroum, N.**, Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., Maltout, A. F. Isolation of a bacteriocinproducing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. (2000) *J. Appl. Microbiol.*, 89: 960-968
- Benkerroum, N**, et A.Y Tamime. «Technology transfer of some Moroccan: a review.» (2004) *Food Microbiol* 21: 399–413.
- Bennik, M.H.J**, B Vanloo , R Brasseur, L.G.M Gorris, et E.J Smid. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. (1998) *Biochim Biophys Acta* 1373: 47-58.
- Benouda A**, Elhamzaui S. *Staphylococcus aureus* : épidémiologie et prévalence des souches résistantes à la méthicilline (SARM) au Maroc (2009). *Revue Tunisienne d'Infectiologie* 1:15- 20
- Beukes M**, Bierbaum G, Sahl HG, Hastings JW. Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061 (2000) *Appl Environ Microbiol* 66:23–28.
- Bonelli R**, Schneider T, Sahl G, Wiedemann I. Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. (2006) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50:1449-1457.
- Boudjemaa, Khaled.** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactisérum par *streptococcus thermophilus*. (2008) Mémoire de magister. option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés
- Boukhatem, M. N.**, Ferhat, M. A., Mohamed, R. H., & Lalaoui, N. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococci* isolated from Kolea Hospital (Algeria). (2015) *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 7(2), 260-269.
- Bourgeois C.M.**, Mescle J.F., Zucca J. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. (1989) Lavoisier. Paris. P. 216-244.

- Bourgeois**, C.M., et Larpent, J.P. Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. (1996). *Tec bacteria in food & Doc*, Lavoisier. Paris. 432-704.
- Bousmaha**, L., Ouhssine, M., & El Yachiouia, M. Fermentation du citron par inoculation microbienne. (2006) *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 2(1).
- Bouvet** A. Centre National de référence des streptocoques, Hôtel Dieu, Université Paris VI (2010) cours en ligne archive de bactériologie générale; Streptocoques-Entérocoques.
- Bouvet** P J M et Crimont PAD. Acinetobacter (1989) In : Le MINOR L et VERON M, eds. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion; 599-604.
- Braun** V, Pils H, Gross P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution (1994) *Arch Microbiol* 161:199–206.
- Breukink**, E., & de Kruijff, B. Lipid II as a target for antibiotics (2006). *Nature reviews Drug discovery* 5(4), 321.
- Breukink**, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J., & de Kruijff, B. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. (2003) *Journal of Biological Chemistry* 278(22).
- Broadbent**, J. R.; Chou, C.; Guillies, K. and Kondo, J. K. Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. (1989) *J. Dairy Sci* 72, 3342- 3345.
- Broütz**, H., & Sahl, H. G. New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target. (2000) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 1–6.
- Brul**, S., & Coote, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms (1999) *International journal of food microbiology* 50(1-2), 1-17.
- Budič**, M., Rijavec, M., Petkovšek, Ž., & Žgur-Bertok, D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. (2011) *PLoS One* 6(12), e28769.
- Bush**, K. Antibacterial drug discovery in the 21st century. (2004) *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 10-17.
- Butler**, D.A., Lobregat, C.M., Gavan, T.L., Reproducibility of the analytab (API 20E) system. (1975) *Journal of clinical microbiology*. 2, 322-326.
- Calvez**, S., Belguesmia, Y., Kergourlay, G., Prévost, H., et Drider D. Les bactériocines : de la synthèse aux applications in : Drider D et Prévost H. Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles (2009) 110 p. Ed ECONOMICA. Paris.
- Carbonnelle**, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargues, R., Bactériologie médicale Techniques Usuelles, (1987) SIMEP-MASSON Paris.
- Carlet** J, Jarlier V, Harbarth S, Voss A, Goossens H, Pittet D. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action (2012) *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 1:11
- Carlet**, J. The world alliance against antibiotic resistance: consensus for a declaration (2015) *Clinical Infectious Diseases* 60(12), 1837-1841.
- Casaus**, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Holo, H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin (1997) *Microbiology* 143, 2287–2294.
- Chain**, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., & Sanders, A. G. Penicillin as a chemotherapeutic agent. (1940) *The lancet* 236(6104), 226-228.
- Chakrani** Soumaya. L'infection urinaire dans le service d'urologie de l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat. (Thèse) (2013) N 41 (Maroc).
- Chen** H, Hoover DG: Bacteriocins and their food applications (2003) *Compr Rev Food Sci F* 2:82-100.
- Chi**, H., & Holo, H. Synergistic antimicrobial activity between the broad spectrum bacteriocin garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B against gram-positive and gram-negative bacteria (2018) *Current microbiology* 75(3), 272-277.
- Chikindas**, M. L., García-Garcerá, M. J., Driessen, A. J., Ledebøer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., & Venema, G. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1. 0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells (1993) *Appl. Environ. Microbiol* 59(11), 3577-3584.
- Chikindas**, M.L., Venema, K., Ledebøer, A.M., Venema, G., Kok, J. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts (1995) *Lett. Appl. Microbiol* 21, 183 – 189.
- Chouaib** Ali. Les infections urinaires nosocomiales en urologie (Thèse). Faculté de médecine et de pharmacie Fès (2007) Maroc.
- Christ**, K., Wiedemann, I., Bakowsky, U., Sahl, H.G., Bendas, G. The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques. (2007) *B.B.A.* 1768, 694–704.

- Cintas**, L. M., J. M. Rodriguez, M. F. Fernandez, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernandez, and H. Holo. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. (1995) *Appl. Environ. Microbiol* 61:2643–2648.
- Cintas**, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernandez, I. F. Nes, and L. S. Havarstein. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. (1998) *J. Bacteriol* 180:1988–1994.
- Cintas**, L.M., Casaus, P., Herraz, C., Havarstein, L.S., Helge, H., Hernandez, P. and Nes, I.F. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q (2000) *J Bacteriol* 182, 6806–6814.
- Clarridge**, J.E., 3rd, Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. (2004) *Clinical microbiology reviews*. 17, 840-862, table of contents.
- Cocaign-Bousquet**, M, C Garrigues, P Loubière, et N.D Lindley. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. (1996) *Antonie van Leeuw* 70: 253-267.
- Collins**, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Fergus, S., & Jones, D. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, Carnobacterium. (1987) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(4), 310-316.
- Cooke** R.D., Twiddy D.T., Reilly P.J.A., Lactic acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. (1987) *FEMS Microbiol. Rev* 46: 369–379.
- Corrieu** G. Luquet FM. The taxonomy of lactic acid bacteria. In: « Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments ». (2008) TEC&DOC/ Lavoisier éd. Paris. France. 19-106.
- Cotter** P, Hill C, Ross P. Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food (2005) *Nature Reviews Microbiology* 3:777.
- Cotter**, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? (2013) *Nature Reviews Microbiology* 11(2), 95.
- Cui** Y, Zhang C, Wang Y, Shi J, Zhang L, Ding Z, Qu X, Cui H. Class IIa bacteriocins: diversity and new developments (2012) *Int J Mol Sci* 13:16668–16707.
- Da Costa**, M.S., Nobre, M.F., and Rainey, F.A. The genus *Thermus*. (2001) In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 2nd edn. Boone, D.R., Castenholz, R.W., and Garrity, G.M. (eds). Berlin, Germany: Springer, pp. 404–414
- Dalet**, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., & Héchard, Y. The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. (2000) *Current microbiology*, 41(6), 441-443.
- Damelin** L.H., Dykes G.A., von Holy A. Biodiversity of lactic acid bacteria from food related ecosystems. (1995) *Microbios* 83: 13–22.
- Davis**, I. What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. (1999) *Molecular Microbiology* 4, 1227-1232.
- De Roissart**, H. & Luquet, F. M. Bactéries Lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques (1994) Uriage: Lorica.
- De Vos** P. Garrity GM. Jones D. Krieg NR. Ludwig W. Rainey FA. Schleifer KH. Whitmanet WB. Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes ». (2009) Vol 3. Springer éd., New York. pp. 19-511.
- De Vuyst** L, Leroy F: Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. (2007) *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:194-199.
- De Vuyst**, L, et E.J Vandamme. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. (1994) Springer US.
- Deegan**, L.H, P.D Cotter, et C Hill. «Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension.» (2006) *Int Dairy J* 16 1058-1071.
- Dellaglio**, F, H de Roissart, S Torriani, M.K Curk, et D Janssens. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques. (1994) Édité par H Roissart, & F.M Luquet. Paris: Lavoisier.
- Desiderio**, D. M. (1954). U.S. Patent No. 2,678,515. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Desmazeaud** M. Bactéries lactiques et qualité des fromages. (1998) Jouy-en-Josas, France : Laboratoire de Recherches laitières, INRA
- Desmazeaud**, M. Rôles des cultures de microorganismes dans la flaveur et la texture des produits laitiers fermentés. (1990) Fédération internationale de Laiterie ; Bruxelles (BEL), and Proceeding of the International Dairy Congress Biotechnology-Milk Products.

- Desmazeaud**, M. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. (1983) *Le lait*, 63(629-630), 267-316.
- Dicks**, L. M. T., Dellaglio, F., & Collins, M. D. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. (1995) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45(2), 395-397.
- Dicks**, L. M. T., Heunis, T. D. J., Van Staden, D. A., Brand, A., Noll, K. S., & Chikindas, M. L. Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. (2011) Springer, New York, NY pp. 391-421.
- Diep**, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., & Nes, I. F. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(7), 2384-2389.
- Diop**, M. B., Dubois Dauphin, R., Dortu, C., Destain, J., Tine, E., & Thonart, P. In vitro detection and characterization of bacteriocin-like inhibitory activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Senegalese local food products . (2008) *African Journal of Microbiology Research* 2(8).
- Doleyres**, Y., Paquin, C., LeRoy, M., & Lacroix, C. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free-and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium (2002) *Applied microbiology and biotechnology* 60(1-2), 168-173.
- Dortu**, C, and P Thonart. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires (2009) *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13 :143-154.
- Drider** Djamel et Hervé PREVOST, Bactéries lactiques, Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, Economica (2009) 593 p., chap. II (« Métabolisme des bactéries lactiques, Devenir du carbone, Pascal LOUBIERE, Muriel COCAIGN-BOUSQUET »)
- Drider**, D., & Rebuffat, S. (Eds.). *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. (2011) *Springer Science & Business Media*.
- Drider**, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. (2006). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(2), 564-582.
- Drouault**, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D., & Renault, P. Expression of the *Staphylococcus hyicus* Lipase in *Lactococcus lactis*. (2000) *Appl. Environ. Microbiol* 66(2), 588-598.
- Du Toit**, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., & Holzapel, W. H. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. (2000) *Journal of Applied Microbiology* 88, 482-494.
- Dupont**, I. Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. (1998) Université Laval.
- Ecker**, K.F. Bacteriocin and food applications. (1992) *Dairy Food Environ Sanit* 12: 204-209.
- EFSA**. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006 (2007). The EFSA Journal, 130.
- Egan**, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., and Cotter, P. D. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems (2016) *Front. Microbiol* 7:461.
- Eijsink**, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H., & Nes, I. F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication (2002) *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4), 639-654.
- Eili Klein**. Y., Makowsky, M., Orlando, M., Hatna, E., Braykov, N. P., & Laxminarayan, R. Influence of provider and urgent care density across different socioeconomic strata on outpatient antibiotic prescribing in the USA (2015), 70(5), 1580-1587.
- Elmoualdi**, L., Labioui, H., Boushama, L., Benzakour, A., Ouhssine, M., El Yachoui, M. Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*. (2008) *Bull. Soc.Pharm.* Bordeaux, 147 : 7-18.
- Ennahar** , S, et al. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. (1996) *Appl Envi Microbiol* 62: 4381-4387.
- Ennahar** , S, T Sashihara, K Sonomoto, and A Ishizaki . Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. (2000) *FEMS Microbiol Rev* 24: 85-106.
- Ennahar** S, Toshihiro S, Kenji S, Ayaaki I. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity (2000) *FEMS Microbiology Reviews* 24:85-106.
- Ennahar**, S, D Aoude-Werner, O Assobhei, et C Hasselmann. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. (1998b) *J Appl Microbiol* 85: 521-526.
- Ennahar**, S, O Assobhel, and C Hasselmann. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer." (1998a) *J food protection* 2: 186-91.

- Ennahar, S, Y Asou, T Zendo, K Sonomoto, et A Ishizaki.** Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by cheese-isolated *Enterococcus faecium* WHE 81. (2001) *Int. J. Food Microbiol* 70: 291–301.
- European centre for disease prevention and control (ECDC)/ European Food Safety Authority (EFSA)/European medicines agency (EMA).** Second joint report on integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and foodproducing animals (JIACRA). (2017) Accessible à l'URL : http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_001863.jsp&mid=WC0b01ac0580c0fa1d
- Euzeby, J. P., Hoyles, L., Kämpfer, P., Oren, A., Sadtler, G. S., Trüper, H. G., & Tindall, B. J.** 'List of Changes in Taxonomic Opinion': making use of the new lists (2004) *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(5), 1429-1430.
- Fernandez, B., Hammami, R., Savard, P., Jean, J., & Fliss, I.** *Pediococcus acidilactici* UL 5 and *Lactococcus lactis* ATCC 11454 are able to survive and express their bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions (2014) *Journal of applied microbiology* 116(3), 677-688.
- Field D, Connor R, Cotter PD, Ross RP, Hill C.** In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *staphylococcus* biofilms. (2016) *Frontiers in Microbiology* 7:508
- Figuigui S, Taghouti A, Benjelloun S, Khalki H Mahmoud M.** Prévalence des pneumopathies a germes multiresistants isoles en reanimation au CHU hassan II de FES. (2013) 5èmes Journées Scientifiques de la Société Marocaine de Microbiologie Médicale. Disponible en ligne sur: <https://sites.google.com/site/5jssmamm/communications-affichees---resumes>
- Fitton, S. E., A. Dell, and W. V. Shaw.** The amino acid sequence of the delta hemolysin of *Staphylococcus aureus*. (1980) *FEBS Lett.* 115:209–212.
- Fleming, A., Florey, H. W., Bodenham, D. C., Cutler, E. C., Hudson, R. V., Christie, R. V., ... & ROBINSON, J.** Discussion on Penicillin (1944). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 37(3), 101-12.
- Fluckiger U, Widmer AF.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1999) *Chemotherapy* 45:121-134
- Forrest, G.N.,** PNA FISH: present and future impact on patient management. (2007) *Expert review of molecular diagnostics.* 7, 231-236.
- Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A.** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme (2007) *FEMS Microbiol Rev* 31:293–310. **Franz, C., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E.** Enterococci at the crossroads of food safety (1999) *Int J Food Microbiol* 47: 1–24.
- Frederic q.** Sur la sensibilité et l'activité antibiotique des Staphylocoques. (1946) *Comptes-rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 140: 1167–1170.
- Fredericq, P.** Colicins (1957) *Ann. Rev. Microbiol* 11: 7-22.
- Fredericq, P.** Colicines et autres bactériocines (1963) *Ergeb. Mikrobiol. Immunol. Exp. Therap. Berlin* 37:1 14-161.
- Fukushima, H., Fukushima, S., Umemoto, T., Fukuhara, H., & Sagawa, H.** Purification and chemical analysis of a bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* RM-10 (1982) *Archives of oral biology*, 27(9), 721-727.
- Galesloot, T. E.** An early gas defect in cheese caused by *Betacoccus* (*Leuconostoc*) species, with some remarks about the nomenclature of *Betacoccus* (*Leuconostoc*) species (1950) *Nederlandsch Melk-en Zuiveltijdschrift* 4(4), 274-87.
- Galvez, A, H Abriouel, R.L Lopez, et N Ben Omar.** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. (2007) *Int J Food Microbiol* 120: 51–70.
- Gálvez, A, H Abriouel, R L Lopez, et N Ben Omar.** «Bacteriocin-based strategies.» (2007) *Int J Food Microbiol* 120: 51-70.
- Garcia J, Ortiz J, Garnacho F, Jimenez C, Perez A, Barrero, Gili M.** Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. (2001) *Clinical Infectious Diseases* 33:939-946
- Garg, N., Salazar-Ocampo, L. M., & van der Donk, W. A.** In vitro activity of the nisin dehydratase NisB. (2013) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(18), 7258-7263.
- Gavin, P.J., Warren, J.R., Obias, A.A., Collins, S.M., Peterson, L.R.,** Evaluation of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of gram-negative bacilli and members of the family Streptococcaceae.

- (2002) *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 21, 869-874.
- Gevers**, D. Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. (2002) Ph.D Thesis. Gent University, Gent, Belgium
- Ghali**, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N., & Thonart, P. Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 C storage (2006) *Journal of food protection* 69(5), 1066-1071.
- Giacometti** A, Cirioni O, Barchiesi F, Scalise G. In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. (2000) *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 38:115-118.
- Girard** S. Le monde des fromages, Éditions Hatier, Paris, France, 1994.
- Goulet** V., C. Jacquet, P. Martin, V. Vaillant, E. Laurent and H. de Valk. Surveillance de la listériose humaine en France, 2001. (2004) *Bull Epidemiol Hebd.* 9:33–5.
- Gratia**, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille (1925) *Comptes rendus des séances de la société de biologie et de ses filiales* 93, 1040-1041.
- Gravesen**, A., Axelsen, A. M. J., Da Silva, J. M., Hansen, T. B., & Knöchel, S. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. (2002) *Appl. Environ. Microbiol* 68(2), 756-764.
- Green**, J.D., Klaenhammer, T.R. Factors involved in adherence of *lactobacilli* to human Caco-2 cells (1994) *Appl. Environ. Microbiol* 60, 4487–4494.
- Grundmann**, H., Glasner, C., Albiger, B., Aanensen, D. M., Tomlinson, C. T., Andrasević, A. T., ... & Glupczynski, Y. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. (2017) *The Lancet Infectious Diseases* 17(2), 153-163.
- Guder**, A., Wiedemann, I., & Sahl, H. G. Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics (2000) *Peptide Science* 55(1), 62-73.
- Guinane**, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. (2005) *Journal of Applied Microbiology* 98(6), 1316-1325.
- Guinane**, C.M, P.D Cotter, E.M Lawton, C Hill, et P Ross. Insertional mutagenesis to generate lantibiotic resistance in *Lc. lactis*. (2007) *Appl Environ Microbiol* 73: 4677- 4680 .
- Hadji-Sfaxi**, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay- Libiberté, G., Barbier, G., Haertlé, T., Chobert, J. M. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. (2011) *Food Control.*, 22: 2020-2027.
- Hammi** I. Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français (Thèse). (2016) Maroc/France.
- Hammi** I, Amensag K, Ennahar S, Delalande F, Marchioni E, Cianferani S, Belkhou R. Native production of pediocin PA-1 by *Enterococcus faecium* E16 isolated from goats' cheese. (2019) *Journal of Food and Nutrition Research* 58:1-8
- Hammi**, I., Amensag, K., Ennahar, S., Delalande, F., Marchioni, E., Cianferani, S., Belkhou, R. Native production of pediocin PA-1 by *Enterococcus faecium* E16 isolated from goats cheese. (2018) *Journal of Food and Nutrition Research*
- Hammi**, I., Delalande, F., Belkhou, R., Marchioni, E., Cianferani, S., & Ennahar, S. Maltarin CPN, a new class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CPN isolated from mould-ripened cheese. (2016) *Journal of Applied Microbiology* 121(5), 1268–1274.
- Hamon**, Y. Les bactériocines. (1964) *Annls Ins? Pasteur, Paris, Suppl.* 5, 18.
- Hanchi**, H., Hammami, R., Fernandez, B., Kourda, R., Ben Hamida, J., & Fliss, I. Simultaneous production of formylated and nonformylated enterocins L50A and L50B as well as 61A, a new glycosylated durancin, by *Enterococcus durans* 61A, a strain isolated from artisanal fermented milk in Tunisia. (2016) *Journal of agricultural and food chemistry* 64(18), 3584-3590.
- Hanchi**, H., Hammami, R., Gingras, H., Kourda, R., Bergeron, M. G., Ben Hamida, J & Fliss, I. Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics. (2017) *Future microbiology* 12(3), 205-212.

- Hassan**, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. (2012) *Journal of applied microbiology* 113(4), 723-736.
- Hastings**, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C., & Stiles, M. E. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. (1991) *Journal of Bacteriology* 173(23), 7491-7500.
- Haugen** HS, Kristiansen PE, Fimland G, Nissen-Meyer J. Mutational analysis of the class IIa bacteriocin curvacin A and its orientation in target cell membranes. (2008) *Appl Environ Microbiol* 74: 6766–6773.
- Héchar**d, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., & Frère, J. Analysis of σ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EIIMan) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. (2001) *Microbiology* 147(6), 1575-1580.
- Hegemann** JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA. Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products (2015) *Acc Chem Res* 48:1909–1919.
- Henderson**, J. T., Chopko, A. L., & Van Wassenaar, P. D. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. (1992) *Archives of biochemistry and biophysics*, 295(1), 5-12.
- Heng**, N. C., & Tagg, J. R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. (2006) *Nature Reviews Microbiology* 4(2), 160.
- Holck**, A.L., Axelsson, L., Birkeland, S., Aukrust, T. and Blom, H. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. J. (1992) *Gen. Microbiol.* 138, 2715^ 2720.
- Holz**apfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. (2001) *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s.
- Hooper** DC Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. (2001) *Emerging Infectious Diseases* 7:337-341
- Howell**, T.H, J.P Fiorellini, P Blackburn, S.J Projan, J de la Harpe, et R.C Williams. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. (1993) *J Clin Periodontol* 20: 335-339.
- <https://sante-medecine.journaldesfemmes.fr/faq/32863-infection-pulmonaire-symptomes-causes-et-traitement> consulté le 21.03.2019.
- <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/r%C3%A9sistance-aux-antibiotiques>
- Hu**, C.-B., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. Description of durancin TW-49M, A novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49. (2008) *Journal of Applied Microbiology* 105(3), 681–690.
- Izquierdo** E, Bednarczyk A, Schaeffer C, et al. Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. (2008) *Antimicrob Agents Chemother* 52(6):1917-23.
- Jack**, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. (1995) *Microbiol Mol Biol Rev* 59(2), 171-200.
- Jehl** F, Bonnet R, Bru J, Caron F, Cattoen C, Cattoir V. Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition (2019) : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie ED 2019 V.1.0 Janvier. 35-63
- Jett** B, Gilmore M. The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin encoded by pAD1 extends to the oral streptococci. (1990) *Journal of dental research* 69:1640-1645.
- Jiménez-Díaz**, R., R. M. Ríos-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruiz-Barba, and J. C. Piard. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. (1993) *Appl. Environ. Microbiol* 59:1416–1424.
- Joerger**, M. C., & Klaenhammer, T. R. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. (1986) *Journal of bacteriology* 167(2), 439-446.
- Juarez** Tomas, M. S., Bru, E., Wiese, B., de Ruiz Holgado, A. A. P., & Nader-Macías, M. E. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. (2002) *Journal of Applied Microbiology* 93(4), 714-724.
- K**, M. Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats de bactéries lactiques et détermination du spectre d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. (2013) (Doctoral thèse, Université de Mascara).

- Kandler**, O. and Weiss, N. Genus *Lactobacillus* (1986) In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1209-1234. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Kang**, K.H, H.J Shin, Y.H Park, and T.S Lee. Studies on the antibacterial substances produced by lactic acid bacteria: purification and some properties of antibacterial substance "Bifilong" produced by *B. longum*. (1989) *Korean Dairy Sci* 1: 204–16.
- Karovičová**, J., Kohajdová, Z., Šimko, P., & Lukáčová, D. Using capillary isotachopheresis for the determination of biogenic amines and D-isocitric acid in food products (2003) *Food/Nahrung* 47(3), 188-190.
- Karthikeyan**, V., & Santhosh, S. W. Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic (2009) *Pakistan J. nutrition* 8, 335-340.
- Kawulka** K, Sprules T, McKay RT, Mercier P, Diaper CM, Zuber P, Vederas JC. Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine (2003) *J Am Chem Soc* 125:4726–4727.
- Kemperman** R, Jonker M, Nauta A, Kuipers OP, Kok J: Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752 (2003) *Appl Environ Microbiol* 69:5839-5848.
- Khaoua**, S, N.E El Haloui , et G Lefebvre . Caractérisation, purification et détermination de la structure partielle d'une bactériocine de la souche *Lactococcus lactis* C16. (1997) *Actes Inst Agron Veto* 17: 15-25.
- Kingcha** Y, Tosukhowong A, Zendo T, Roytrakul S, Luxananil P, Chareonpornsook K, Valyaseyi R, Sonomoto K, Visessanguan W: Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. (2012) *Food Control*, 25:190-196.
- Kjos** M, Borrero J, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, Snipen L, Hernández PE, Nes IF, Diep DB. (2011) Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256–3267. doi:10. 1099/mic.0.052571-0
- Klaenhammer**, T.R, R Barrangou, B Logan Buck, and M.A Azcarate-Peril. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. (2005) *FEMS Microbiol. Rev* 29: 393-409.
- Klaenhammer**, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. (1988) *Biochem* 70: 337-349.
- Klaenhammer**, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. (1988) *Biochimie* 70: 337-349.
- Klaenhammer**, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. (1993) *FEMS Microbiol Rev* 2: 39-85.
- Kleerebezem** M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis (2004) *Peptides* 25: 1405–1414.
- Klein**, G, A Pack, C Bonaparte, et G Reuter. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. (1998) *Int J Food Microbiol* 41: 103–125.
- Knoetze**, H., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media (2008) *International journal of antimicrobial agents* 31(3), 228-234.
- Kohanski**, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks (2010) *Nature Reviews Microbiology* 8(6), 423.
- Kramer**, N. E., van Hijum, S. A., Knol, J., Kok, J., & Kuipers, O. P. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(5), 1753-1761.
- Kröckel**, L., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Bantleon, A., & Ludwig, W. *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage (2003) *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53(2), 513-517.
- Labioui**, H., Elmoualdi, L., El Yachoui, M., Ouhssine, M. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. (2005) *Bull. Soc.Pharm.* Bordeaux, 144 : 237-250.
- Lai AC-Y**, Tran S, Simmonds RS. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (2002) *FEMS Microbiol Lett* 215:133–138.
- Larpent** J P. Analyse des croûtes de fromage (1997) in : « Microbiologie Alimentaire ».Technique et Documentation, 1ère éd., Lavoisier, Paris. www.exptdf.com/microbiologie-alimentaire-techniques-de-laboratoire-j-p-larpent-1997-pdf.html
- Larpent J-P**, Larpent-Gourgau M (1997) *Mémento Technique de Microbiologie* (3édn). Lavoisier: Londres, New York, Paris; 1039 p.
- Laurent**. F. Principales β-lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de β - lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes (2009) *Groupement Hospitalier Nord Lyon*. P 8.

- Leavitt**, R. W., Braithwaite, C., & Jensen, M. M. Colicin V38 and microcin C38 produced by *Escherichia coli* strain 38 (1997) *Avian diseases* 568-577.
- Lee**, K. Y., and T. H. Birkbeck. In vitro synthesis of the delta-lysin of *Staphylococcus aureus*. (1984) *Infect. Immun* 44:434-438.
- Leikoski**, N., Fewer, D. P., Jokela, J., Alakoski, P., Wahlsten, M., & Sivonen, K. Analysis of an inactive cyanobactin biosynthetic gene cluster leads to discovery of new natural products from strains of the genus *Microcystis* (2012) *PLoS One* 7(8), e43002.
- Leroy**, F., & De Vuyst, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry (2004) *Trends in Food Science & Technology* 15(2), 67-78.
- Lim**, S. M. Cultural conditions and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21. (2010) *Food Science and Biotechnology* 19(3), 793-802.
- Limonet**, M., Revol-Junelles, A. M., & Millière, J. B. Variations in the membrane fatty acid composition of resistant or susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* strains in the presence or absence of Mesenterocin 52A and Mesenterocin 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 (2002) *Appl Environ Microbiol* 68(6), 2910-2916.
- Liu S**, Lin C, Chu L, Su T, Lin Y, Chiu C. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan (2006) *International Journal of Antimicrobial Agents* 27:81-84
- Liu X**, Vederas JC, Whittall RM, Zheng J, Stiles ME, Carlson D, Franz CM, McMullen LM, van Belkum MJ. Identification of an Nterminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. (2011) *J Agric Food Chem* 59:5602-5608.
- Liu**, Y., Manna, A. C., Pan, C. H., Kriksunov, I. A., Thiel, D. J., Cheung, A. L. Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 2392-2397.
- Lode**, H. Safety and tolerability of commonly prescribed oral antibiotics for the treatment of respiratory tract infections (2010) *The American journal of medicine* 123(4), S26-S38.
- Lubelski**, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G.N. and Kuipers, O.P. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin (2008) *Cell Mol Life Sci* 65, 455-476.
- Luchansky**, J. B., & Call, J. E. Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. (2004) *Journal of food protection* 67(5), 1017-1021.
- Lüders** T, Birkemo GA, Fimland G, Nissen-Meyer J, Nes IF. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. (2003) *Appl Environ Microbiol* 69:1797-1799.
- Luders**, E., Thompson, P. M., Kurth, F., Hong, J. Y., Phillips, O. R., Wang, Y., ... & Toga, A. W. Global and regional alterations of hippocampal anatomy in long-term meditation practitioners (2013) *Human brain mapping* 34(12), 3369-3375.
- Lyons**, S. R., Griffen, A. L., & Leys, E. J. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria (2000) *Journal of clinical microbiology* 38(6), 2362-2365.
- Madigan**. M et Martinko. J. Biologie de Micro-organismes (2007) Université Carbondale de l'Illinois du sud .11e édition. P 702,705, 711,860, 862.
- Makhloufi**, K. M. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. (2011) (Doctoral dissertation).
- Maksimov** MO, Pan SJ, Link AJ. Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering (2012) *Nat Prod Rep* 29:996-1006.
- Maqueda** M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E, Martínez-Bueno M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. (2008) *FEMS Microbiol Rev* 32:2-22.
- Marchou**, B., Bellido, F., Charnas, R., Lucain, C., & Pechère, J. C. Contribution of beta-lactamase hydrolysis and outer membrane permeability to ceftriaxone resistance in *Enterobacter cloacae*. (1987) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31(10), 1589-1595.
- Marcis** et O, Jeronimus-Stratingh MC, Mollet B, Poolman B. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. (1997) *J Biol Chem* 272:14277- 14284.
- Martin** Dworkin, The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Bacteria: Firmicutes, *Cyanobacteria*. (2006) New York, *Springer-Verlag New York Inc*.
- Martin-Belloso**, O. Pros and cons of minimally processed foods. (2007) *Trends Food Sci. Technol* 18, 582

- Martínez**, B., Fernández, M., Suárez, J. E., & Rodríguez, A. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. (1999) *Microbiology* 145(11), 3155-3161.
- Masuda** Y, Zendo T, Sonomoto K. New type non-lantibiotic bacteriocins: circular and leaderless bacteriocins. (2012) *Benef Microbes* 3:3– 12.
- Mataragas**, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., & Drosinos, E. H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. (2003) *Meat Science* 64(3), 265-271.
- Mathur** H, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. The sactibiotic subclass of bacteriocins: an update. (2015) *Curr Protein Pept Sci* 16:549– 558.
- Matthieu** Gregoire, « Quinolones » [archive], sur pharmacomedicale.org
- Mavaro** A, Abts A, Bakkes PJ, Moll GN, Driessen AMJ, Smits SHJ, Schmitt L. Substrate recognition and specificity of NisB, the lantibiotic dehydratase involved in nisin biosynthesis. (2011) *J. Biol. Chem* 286, 30552–30560.
- McAuliffe**, O, T O'Keeffe, C Hill, and R.P Ross. Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR. (2001) *Mol Microbiol* 39: 982-993.
- McAuliffe**, O., Ross, R. P., & Hill, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action (2001) *FEMS microbiology reviews* 25(3), 285-308.
- McCormick**, J. K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K. L., McMullen, L. M., ... & Van Belkum, M. J. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibiotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. (1998) *Appl. Environ. Microbiol* 64(12), 4757-4766.
- Medema** MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, de Bruijn I, Chooi YH, Claesen J, Coates RC, Cruz-Morales P, Duddela S, Düsterhus S, Edwards DJ, Fewer DP, Garg N, Geiger C, Gomez-Escribano JP, Greule A, Hadjithomas M, Haines AS, Helfrich EJN, Hillwig ML, Ishida K, Jones AC, Jones CS, Jungmann K, Kegler C, Kim HU, Kötter P, Krug D, Masschelein J, Melnik AV, Mantovani SM, Monroe EA, Moore M, Moss N, Nützmann H-W, Pan G, Pati A, Petras D, Reen FJ, Rosconi F, Rui Z, Tian Z, Tobias NJ, Tsunematsu Y, Wiemann P, Wyckoff E, Yan X, Yim G, Yu F, Xie Y, Aigle B, Apel AK, Balibar CJ, Balskus EP, Barona-Gómez F, Bechthold A, Bode HB, Borriss R, Brady SF, Brakhage AA, Caffrey P, Cheng Y-Q, Clardy J, Cox RJ, De Mot R, Donadio S, Donia MS, van der Donk WA, Dorrestein PC, Doyle S, Driessen AJM, Ehling-Schulz M, Entian K-D, Fischbach MA, Gerwick L, Gerwick WH, Gross H, Gust B, Hertweck C, Höfte M, Jensen SE, Ju J, Katz L, Kaysser L, Klassen JL, Keller NP, Kormanec J, Kuipers OP, Kuzuyama T, Kyrpidis NC, Kwon H-J, Lautru S, Lavigne R, Lee CY, Linquan B, Liu X, Liu W, Luzhetskyy A, Mahmud T, Mast Y, Méndez C, Metsä-Ketelä M, Micklefield J, Mitchell DA, Moore BS, Moreira LM, Müller R, Neilan BA, Nett M, Nielsen J, O'Gara F, Oikawa H, Osbourn A, Osburne MS, Ostash B, Payne SM, Pernodet J-L, Petricek M, Piel J, Ploux O, Raaijmakers JM, Salas JA, Schmitt EK, Scott B, Seipke RF, Shen B, Sherman DH, Sivonen K, Smanski MJ, Sosio M, Stegmann E, Süßmuth RD, Tahlan K, Thomas CM, Tang Y, Truman AW, Viaud M, Walton JD, Walsh CT, Weber T, van Wezel GP, Wilkinson B, Willey JM, Wohlleben W, Wright GD, Ziemert N, Zhang C, Zotchev SB, Breitling R, Takano E, Glöckner FO. Minimum information about a biosynthetic gene cluster. (2015) *Nat Chem Biol* 11:625–631.
- Medina**, M., Izquierdo, E., Ennahar, S., & Sanz, Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. (2007) *Clinical & Experimental Immunology* 150(3), 531-538.
- Meghrou**, J., Lacroix, C., Bouksaim, M., Lapointe, G., & Simard, R. E. Note: Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719 (1997) *Journal of applied microbiology* 83(2), 133-138.
- Melby** JO, Nard NJ, Mitchell DA. Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates (2011) *Curr Opin Chem Biol* 15:369–378.
- Messens**, W., Verluyten, J., Leroy, F., & De Vuyst, L. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. (2003) *International journal of food microbiology* 81(1), 41-52.
- Metchnikoff**. E, Optimistic studies New York: PutmanYs Sons (1908) 161-183.
- Mollendorff** Von, J. W., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. Optimization of growth medium for production of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* JW3BZ and JW6BZ, and *Lactobacillus fermentum* JW11BZ and JW15BZ isolated from boza (2009) *Trakia Journal of Sciences* 7(1).

- Montalbán-López M**, Sánchez-Hidalgo M, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials (2011) *Curr Pharm Biotechnol* 12:1205– 1220.
- Montville**, T.J, and Y Chen. "Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions ." (1998) *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 511-519.
- Mora**, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Colombo, S., & Galli, A. Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342T and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730T and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. Nov (2003) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(3), 675-678.
- Moraes**, M.P, L.M Perin, M.B.T Otolani, A.K Yamazi, G.N Viçosa, and L.A Nero. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic. (2010) *Food Sci.Technol* 43: 1320-1324.
- Moreno**, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. The role and application of *enterococci* in food and health (2006) *Int. J. Food Microbiol* 106, 1–24.
- Moreno**, M. R. F., Leisner, J. J., Tee, L. K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G & De Vuyst, L. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. (2002) *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 147-157.
- Mouton**. Y, Bingen. E, Deboxker. Y et Dubreuil. L, Antiviraux Anti-infectieux. (2000) Éditions John Libbey Eurotext. Paris.P116.
- Mrich** H. Profil de l'antibio-résistance de l'infection urinaire nosocomiale en urologie expérience du service d'urologie CHU Mohammed VI (Thèse). (2018) Maroc.
- Muriana**, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria spp* in food. (1996) *J. Food Prot.* (Suppl.), 54±63.
- Murphy** K, O'Sullivan O, Rea MC, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Genome mining for radical SAM protein determinants reveals multiple sactibiotic-like gene clusters (2011) *PLoS One* 6:e20852.
- Mylonakis** E., E.L. Hohmann and S.B. Calderwood. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. (1998) *Medicine Baltimore* 77:313–36.
- Naghmouchi** K, Baah J, Hober D, Jouy E, Rubrecht C, Sané F, Drider D. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells (2013) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:2719-2725.
- Naghmouchi**, K., Fliss, I., Drider, D., & Lacroix, C. Pediocin PA-1 production during repeated-cycle batch culture of immobilized *Pediococcus acidilactici* UL5 cells (2008) *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(5), 513-517.
- Naghmouchi**, K., Kheadr, E., Lacroix, C., & Fliss, I. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes* (2007) *Food microbiology* 24(7-8), 718-727.
- Nes**, I. F. History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria (2011) *In Prokaryotic Antimicrobial Peptides* (pp. 3-12).
- Nes**, I. F., D. Bao Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria (1996) *Antonie Leeuwenhoek* 70:113–128.
- Nes**, I. F., S.S Yoon1, et D.B Diep. Ribosomally Synthesiszed Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria. (2007) *Review Food Sci Biotechnol* 16: 675-690.
- Neuman** M. Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiotherapiques antiinfectieux. (1979) Quatrième édition. Maloine S. A., Paris.
- Nicholls** DG, Ferguson S. Chemiosmotic energy transduction. (1992) In: Nicholls DG, Ferguson SJ (eds) *Bioenergetics 2*. Academic Press, London, pp 1±20
- Nilsen**, T., Nes, I. F., & Holo, H.. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5), 2975-2984.
- Nissen-Meyer** J, Holo H, Håvarstein LS, Sletten K, Nes IF. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. (1992) *J Bacteriol* 174:5686–5692.
- Nissen-Meyer** J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. (2010) *Probiotics Antimicrob Proteins* 2:52–60.
- Nissen-Meyer**, J., Holo, H., Harvarstein, L.S., Sletten, K. and Nes, I.F. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 5686- 5692.
- Nissen-Meyer**, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H. S., & Kristiansen, P. E. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. (2009) *Current pharmaceutical biotechnology* 10(1), 19-37.
- Oppegård**, C, P Rogne, L Emanuelsen, P.E Kristiansen, G Fimland, and J Nissen-Meyer. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. (2007) *J Mol Microbiol Biotechnol* 13: 210-219.

- Ortega**, M. A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M. C., van der Donk, W. A., & Nair, S. K. Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB (2015) *Nature* 517(7535), 509.
- Ouwehand**, A. C., & Vesterlund, S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria (2004) *Food Science and Technology-New York-marcel dekker-*, 139, 375-396.
- Ovchinnikov** KV, Kristiansen PE, Straume D, Jensen M, Aleksandrak-Piekarczyk T, Nes, Diep B. The leaderless bacteriocin enterocin K1 is highly potent against *Enterococcus faecium*: A Study on Structure, Target Spectrum and Receptor. (2017) *Frontiers in Microbiology* 8:774.
- Ovchinnikov**, K. V., Chi, H., Mehmeti, I., Holo, H., Nes, I. F., & Diep, D. B. Novel group of leaderless multi-peptide bacteriocins from Gram-positive bacteria. (2016) *Appl. Environ. Microbiol* 82(17), 5216-5224.
- Palumbi**, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force (2001) *Science*, 293(5536), 1786-1790.
- Papp Desiderio**. Histoire des antibiotiques. (1954) In : *Revue d'histoire des sciences et de leurs applications*, tome 7, n°2. pp. 124-138.
- Parada**, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. (2007) *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50(3), 512-542.
- Parente E.** & Ricciardi A., Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 628-638.
- Patton**, G. C., & van der Donk, W. A. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. (2005) *Current opinion in microbiology* 8(5), 543-551.
- Perez**, R. H., Himeno, K., Ishibashi, N., Masuda, Y., Zendo, T., Fujita, K., ... & Sonomoto, K. Monitoring of the multiple bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 through a developed liquid chromatography and mass spectrometry-based quantification system. (2012) *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(5), 490-496.
- Petti**, C.A., Polage, C.R., Schreckenberger, P., The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. (2005) *Journal of clinical microbiology*. 43, 6123-6125.
- Pfeiler**, E.A, and T.R Klaenhammer. The genomics of lactic acid bacteria. (2007) *Trends Microbiol* 15: 546–553.
- Piard**, J.C, et M Desmazeaud. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. *Lait* 71 (1991): 525 - 541.
- Pilet** V. Choix des éleveurs de bovins lait et coûts de transaction ; le cas de l'AOC cantal. (2005) Mémoire de DEA, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, Septembre 2005.
- Powers**, J. H. Antimicrobial drug development—the past, the present, and the future. (2004) *Clinical Microbiology and Infection* 10, 23-31.
- Prescott**, A. M., & Fricker, C. R. Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of *Escherichia coli* in water. (1999) *Molecular and cellular probes* 13(4), 261-268.
- Prescott**, Harley et Klein (2007) *Microbiologie .2e édition française*. P 806, 807, 813, 819.
- Quadri**, L. E. N., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. (1994) *J. Biol. Chem* 269:12204–12211.
- Reddy** Y, K.V, C ARANHA, S.M GUPTA, et R.D YEDERY. Evaluation of Antimicrobial Peptide Nisin as a Safe Vaginal Contraceptive Agent in Rabbits: In Vitro and in Vivo Studies. (2004) *Reproduction* 128: 117-126.
- Reenen**, V. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. (1998) *Journal of Applied Microbiology* 84(6), 1131-1137.
- Reid** G., M. E. Sanders, H. R. Gaskins, G. R. Gibson, A. Mercenier, R. RastaJ/ et T.R. Klaenhammer. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. (2003) *J Clin. Gastroenterol* 137, 105-118.
- Rello**, J., Lode, H., Cornaglia, G., & Masterton, R. A European care bundle for prevention of ventilator-associated pneumonia. (2010) *Intensive care medicine* 36(5), 773-780.
- Rendueles**, O., Beloin, C., Latour-Lambert, P., & Ghigo, J. M. A new biofilm-associated colicin with increased efficiency against biofilm bacteria. (2014) *The ISME journal* 8(6), 1275.
- Ribeiro**, S. C., Ross, R. P., Stanton, C., and Silva, C. Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. (2017) *J. Food Prot* 80, 1303–1316.
- Rihakova**, J., Cappelletti, J. M., Hue, I., Demnerova, K., Fédérighi, M., Prévost, H., & Drider, D. In vivo activities of recombinant divercin V41 and its structural variants against *Listeria monocytogenes*. (2010) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(1), 563-564.
- Roca**, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S. & Kahlmeter, G. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. (2015) *New microbes and new infections* 6, 22-29.

- Rodgers, S.** Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals. (2004) *Trends in Food Science and Technology* 15, 366–372.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., & Kok, J.** Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. (2002) *Critical reviews in food science and nutrition* 42(2), 91-121.
- Rogers, L. A.** The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. (1928) *J. Bacterial*. 16, 321-5.
- Rolinson, G. N., Batchelor, F. R., Butterworth, D., Cameron-Wood, J., Cole, M., Eustace, G. C. & Chain, E. B.** Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis. (1960) *Nature* 187: 236-237.
- Rollema, H. S., Metzger, J. W., Both, P., Kuipers, O. P., & Siezen, R. J.** Structure and biological activity of chemically modified nisin A species. (1996) *European journal of biochemistry* 241(3) 716-722.
- Rosenthal VD, Maki DG, Mehta A, Alvarez- Moreno C, Leblebicioğlu H, Higuera F, Cuellar LE, Madani N, Mitrev Z, Dueñas L, Navoa-Ng JA, Garcell HG, Raka L, Hidalgo RF, Medeiros EA, Kanj SS, Abubakar S, Nercelles P, Pratesi RD.** International nosocomial infection control consortium report. (2007) *American Journal of Infection Control* 36:627-637.
- Ruiz-Barba, J. L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., Jiménez-Díaz, R.** Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. (2010) *Food Microbiol.*, 27: 413-417.
- Salminen, S., & Von Wright, A.** Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. (2004) CRC Press.
- Santé publique France.** Morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France en 2012. Étude Burden BMR, rapport - Juin 2015. Saint-Maurice : Santé publique France - Institut de veille sanitaire ; 2015. 21 p. Accessible à l'URL: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladiesinfectieuses/2015/Morbidite-et-mortalite-des-infections-a-bacteriesmulti-resistantes-aux-antibiotiques-en-France-en-2012>.
- Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S.** Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. (2010) *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 2: 291-297.
- Sass, P., A Jansen, C Szekat, V Sass, H.G Sahl, and G Bierbaum.** The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus* . (2008) *BMC Microbiol* 8: 186.
- Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P.,** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 394-406.
- Sawa, N., Wilaipun, P., Kinoshita, S., Zendo, T., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., & Sonomoto, K.** Isolation and Characterization of Enterocin W, a Novel Two-Peptide Lantibiotic Produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1. (2011) *Applied and Environmental Microbiology* 78(3) 900–903.
- Schleifer, K. H. & Ludwig, W.** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera (1995) *System Appl Microbiol* 18, 461-467.
- Schleifer, K. H., & Kilpper-Bälz, R.** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. (1987) *Systematic and Applied Microbiology* 10(1), 1-19.
- Schöbitz , R, V Suazo, M Costa, and L Ciampi.** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. (2003) *Int J Food Microbiol* 84: 237-244.
- Sedrati A,** 2014. (Thèse) Etude de l'antibiorésistance des souches bactériennes à l'origine des infections infantiles à l'EPH d'Ouargla (Algérie).
- Semasaka G,** 1986. (Thèse) Contribution de la qualité microbiologique des laits caillés commercialisés dans la région de Dakar (Sénégal).
- Settanni, L, and A Corsetti.** Application of bacteriocins in vegetable food. (2008) *Int J Food Microbiol* 121: 123-138.
- Sharma, S., Garg, A.P., Singh, G.** Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production *Lactococcus lactis* CCSULAC1 in modified MRS medium. (2010) *Int. J. Dairy Sci.*, 5: 1-9.
- Shelburne, C. E., An, F. Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D. E., & Lantz, M. S.** The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. (2007) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 297-300.
- Shelburne, C. E., An, F. Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D. E., & Lantz, M. S.** The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. (2007) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59(2), 297-300.
- Sherwood, I. R.** The bacterial flora of new Zealand cheddar cheese. (1939) *J. Dairy Res* 10, 426-448.

- Shewmaker**, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Maria da Gloria, S. C., Elliott, J. A., Joyce, K & Facklam, R. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. (2004) *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(5) 1505-1510.
- Simon**, L., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M. Luminescent method for the detection of antibacterial activities. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol* 57, 757 – 763.
- Spellberg**, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., ... & Infectious Diseases Society of America. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America (2008) *Clinical infectious diseases* 46(2) 155-164.
- Stein**, T., Heinzmann, S., Solovieva, I. and Entian, K.D. Function of *Lactococcus lactis* immunity genes in a model system after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. (2003) *J Biol Chem* 278,89–94
- Stepper** J, Shastri S, Loo TS, Preston JC, Novak P, Man P, Moore CH, Havlíček V, Patchett ML, Norris GE. Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. (2011) *FEBS Lett* 585:645–650.
- Stern**, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P & Seal, B. S. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. (2006) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(9), 3111-3116.
- Stiles**, M. E., & Holzapfel, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy (1997) *International journal of food microbiology* 36(1), 1-29.
- Suda** S, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Lactacin 3147—biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications (2012) *Curr Protein Pept Sci* 13:193–204.
- Sutyak** KE, Anderson RA, Dover SE, Feathergill KA, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML. Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilisin. (2008b) *Infect Diseases Obstet Gynecol* ID 540758, 6.
- Sutyak** KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, Chikindas ML. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. (2008a) *J Appl Microbiol* 104:1067–1074.
- Tabasco, R.**, García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. (2009) *Int. J. Food Microbiol.*, 132: 109-116.
- Tagg** J. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. (2004) *Indian journal of medical research* 119:13-16.
- Tagg**, J.R, and L.W Wannamaker. Genetic basis of streptococcal A-FF22 production. (1976) *Antimicrob Agents Chemother* 10: 299-306.
- Talbert** M, Willoquet.G et Gervais.R. Pharmacologie Clinique (2009) Wolters Kluwer France. P 641, 648,655.
- Taylor** JI, Hirsch A & Mattick TR. The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. (1949) *The Vet Record* 61: 197 – 198.
- Thomas**, T. D., Ellwood, D. C., & Longyear, V. M. C. Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. (1979) *Journal of bacteriology* 138(1), 109-117.
- Thompson**, J, and C.R Gentry-Weeks. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques. (1994) Edited by H De Roissart , & F.M Luquet. Vol. I. Loria.
- Tichaczek**, P. S., NISSEN-MEYER, J.NES, I. F., VOGEL, R. F. & HAMMES, W. P. Characterization of the bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH673. (1992) *Systematic and Applied Microbiology* (in the Press).
- Toba**, T., Samant, S. K., Yoshioka, E., & Itoh, T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. (1991) *Letters in Applied Microbiology* 13(6), 281-286.
- Todorov**, S. D., & Dicks, L. M. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. (2005) *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms* 45(4), 312-322.
- Tong** Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. (2014) *PLoS ONE* 9(2): e89209
- Twomey** D, Ross RP, Ryan M, Meaney B, Hill C. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. (2002) *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:165–185.

- Vadyvaloo, V.**, Arous, S., Gravesen, A., Hechard, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J. W., & Rautenbach, M. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. (2004) *Microbiology* 150(9), 3025-3033.
- Van Belkum, M. J.**, B. J. Hayema, R. E. Jeeninga, J. Kok, and G. Venema. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. (1991) *Appl. Environ. Microbiol* 57:492–498.
- Van Reenen, C. A.**, Chikindas, M. L., Van Zyl, W. H., & Dicks, L. M. T. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. (2003) *International journal of food microbiology* 81(1), 29-40.
- Vandamme, P.**, B Pot, M Gillis, P de Vos, K Kersters, and J Swings. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. (1996) *Microbiol Rev* 60: 407-438.
- Verellen, T. L.**, Bruggeman, G., Van Reenen, C. A., Dicks, L. M., & Vandamme, E. J. Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. (1998) *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86(2), 174-179.
- Verluyten, J.**, Leory, F., De Vuyst, L. Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L.curvatus* LTH 1174. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5081- 5088.
- Vignolo, G.**, Palacios, J., Fariás, M. E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W., & Oliver, G. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. (2000) *Current microbiology* 41(6), 410-416.
- Vollenweider, S.**, & Lacroix, C. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. (2004) *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(1), 16-27.
- Vos, P.**, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2009) 2e. Vol. 3. New York, NY: Springer-Verlag.
- Wang, H. T.**, Yu, C., Hsieh, Y. H., Chen, S. W., Chen, B. J., & Chen, C. Y. Effects of albusin B (a bacteriocin) of *Ruminococcus albus* 7 expressed by yeast on growth performance and intestinal absorption of broiler chickens—its potential role as an alternative to feed antibiotics. (2011) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(13), 2338-2343.
- Wazieres B.**, Rainfray M. Infections urinaires du sujet age (2009) In Belmin J et al. Geriatrie pour le praticien. 2eme edition, Masson, Paris: 367-369.
- Weiss, H. M.** Deconstructing job satisfaction: Separating evaluations, beliefs and affective experiences (2002) *Human resource management review* 12(2), 173-194.
- Wessels, S.**, & Huss, H. H. Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. (1996) *Food Microbiology* 13(4), 323-332.
- Whitehead, H. R.** A substance inhibiting bacterial growth produced by certain strains of lactic streptococci (1933) *Biochem. J* 27:1793.
- Wijaya, A.**, C Neudeker, W Holzapfel, et C Franz. Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. Bologna. (2006) *Proceedings of Food Micro.*
- Willey JM** and van der Donk WA. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. (2007) *Annual Review of Microbiology* 61: 477–501.
- Wirawan, R. E.**, Klesse, N. A., Jack, R. W., & Tagg, J. R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. (2006) *Appl. Environ. Microbiol* 72 (2), 1148-1156.
- Woraprayote W.**, Kingcha Y, Amonphanpokin P, Kruenate J, Zendo T, Sonomoto K, Benjakul S, Visessanguan W: Anti-listeria activity of poly (lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork (2013) *Int J Food Microbiol* 167:229-235.
- World Health Organisation** Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. (2014) WHO Press, Geneva, Switzerland
- Xie, L.**, Miller, L. H., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N. L., & van der Donk, W. A. Lacticin 481: In vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity (2004) *Science* 303, 679–681.
- Xie, Y.**, An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., Zhang, L. Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. (2011) *Food Control*, 22: 1027-1031.
- Yanagida, F.**, Chen, Y., Onda, T. and Shinohara, T. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil (2005) *Lett Appl Microbiol* 40, 430–435.
- Zalan, Z.**, A Barath, and A Halasz. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. (2005) *Food Technol Biotech* 43: 219-225.
- Zendo, T.**, Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. (2003) *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 67(7), 1616-1619.

Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. B. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. (2010) *The protein journal* 29(6), 432-439.

Résumé

L'antibiothérapie a permis de lutter efficacement contre nombre de maladies infectieuses, mais elle commence à atteindre ses limites avec l'émergence des microorganismes multi-résistants. La recherche de molécules alternatives est devenue une nécessité. Ce travail de thèse explore la possibilité d'utiliser des peptides antibactériens (bactériocines) produits par des bactéries comme moyen de lutter contre des bactéries résistantes. Des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocines ont été isolées essentiellement à partir de divers produits alimentaires fermentés marocains. Les bactériocines produites ont été purifiées par des techniques chromatographiques, puis leurs structures ont été élucidées par spectrométrie de masse, par séquençage peptidique et/ou par séquençage nucléotidique. Ceci a permis l'identification d'une ou plusieurs bactériocines par bactérie productrice comme par exemple les entérocoques L50A et L50B produits sous des formes modifiées par *Enterococcus durans* LC2 isolée du lait de chamelle. Parallèlement, une recherche de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques dans des liquides biologiques humains a permis l'isolement de nombreuses bactéries pathogènes Gram+ et Gram-résistantes à une variété d'antibiotiques communément utilisés. Parmi celles-ci, des souches sélectionnées ont ensuite été soumises à l'action des bactériocines purifiées (entérocoques L50A et L50B, nisine Z et pédiocine PA-1) seules et en association avec des antibiotiques. Ceci a permis de démontrer l'efficacité des bactériocines contre des pathogènes multi-résistants et par conséquent d'établir leur potentiel comme recours possible en cas d'inefficacité des antibiotiques.

Mots clés : bactéries lactiques, bactériocines, antibiotiques, bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

Résumé en anglais

Antibiotic therapy has been effective in controlling many infectious diseases, but is slowly reaching its limits with the emergence of multidrug-resistant microorganisms. The search for alternative molecules has become a necessity. This thesis explores the possibility of using antibacterial peptides (bacteriocins) produced by bacteria as a means to fight resistant bacteria. Strains of lactic bacteria producing bacteriocins have been isolated essentially from various fermented Moroccan foods. The bacteriocins produced were purified by chromatographic techniques, and their structures were elucidated by mass spectrometry, peptide sequencing and / or nucleotide sequencing. This allowed the identification of one or more bacteriocins per producing bacterium, e.g. enterocins L50A and L50B produced as modified forms by *Enterococcus durans* LC2 isolated from camel milk. At the same time, the search for multidrug-resistant bacteria in human body fluids has resulted in the isolation of pathogenic bacteria of both Gram types resistant to a variety of commonly used antibiotics. Among these, selected strains were subjected to the action of purified bacteriocins (enterocins L50A and L50B, nisin Z and pediocin PA-1) alone and in combination with antibiotics. This allowed us to show the efficacy of bacteriocins against multi-resistant pathogens, thereby demonstrating their potential as a possible alternative in case of antibiotic inefficiency.

Keywords : Lactic acid bacteria, bacteriocins, antibiotics, multi-drug resistant bacteria.