

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Appliquée



## *Mémoire*

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant  
Filière : Sciences biologiques,  
Spécialité : Microbiologie et hygiène hospitalière.

Par : MENNOUR Manel

LEMENADJLIA Hamza

## *Thème*

**Production et évaluation de l'activité biologique de la  
Microcine J25 sur quelques Entérobactéries  
multirésistantes.**

**Jury d'évaluation :**

Président de jury : Dr. BENHAMDI A.

Rapporteur : Dr. YUCEF ALI M.

Examineur : Dr. ZITOUNI H.

MCB. UFM. Constantine 1.

MCB. UFM. Constantine 1.

MCB. UFM. Constantine 1.

Année universitaire : 2020-2021

# *REMERCIEMENTS*

Nous remercions ALLAH tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénie pour la réalisation de ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice et directrice de mémoire madame « Mounia Youcef Ali » Maitre de conférences en microbiologie pour avoir accepté la charge de nous encadrer

Nous remercions également :

Madame « BENHAMDI Asma » Maitre-assistant à l'Université des frères Mentouri pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme « ZITOUNI Hind » pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail

*\*Merci\**

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon grand-père,

Qu'il puisse reposer en paix.

A ma chère grande mère

A mon père et

A ma douce et tendre mère, le symbole de la tendresse, du courage, de la responsabilité et de l'amour.

En témoignage de ses prières, sa bénédiction, sa patience et ses sacrifices.

Que Dieux te garde, te comble de santé, et te donne longue vie.

A ma deuxième mère, ma chère tante Houria

A mes chers frères Mohamed et Alla eddine, ma fierté dans cette vie.

A ma tendre, gentille et adorable sœur Rahma et son mari Okba et leurs filles Rahil et Racil.

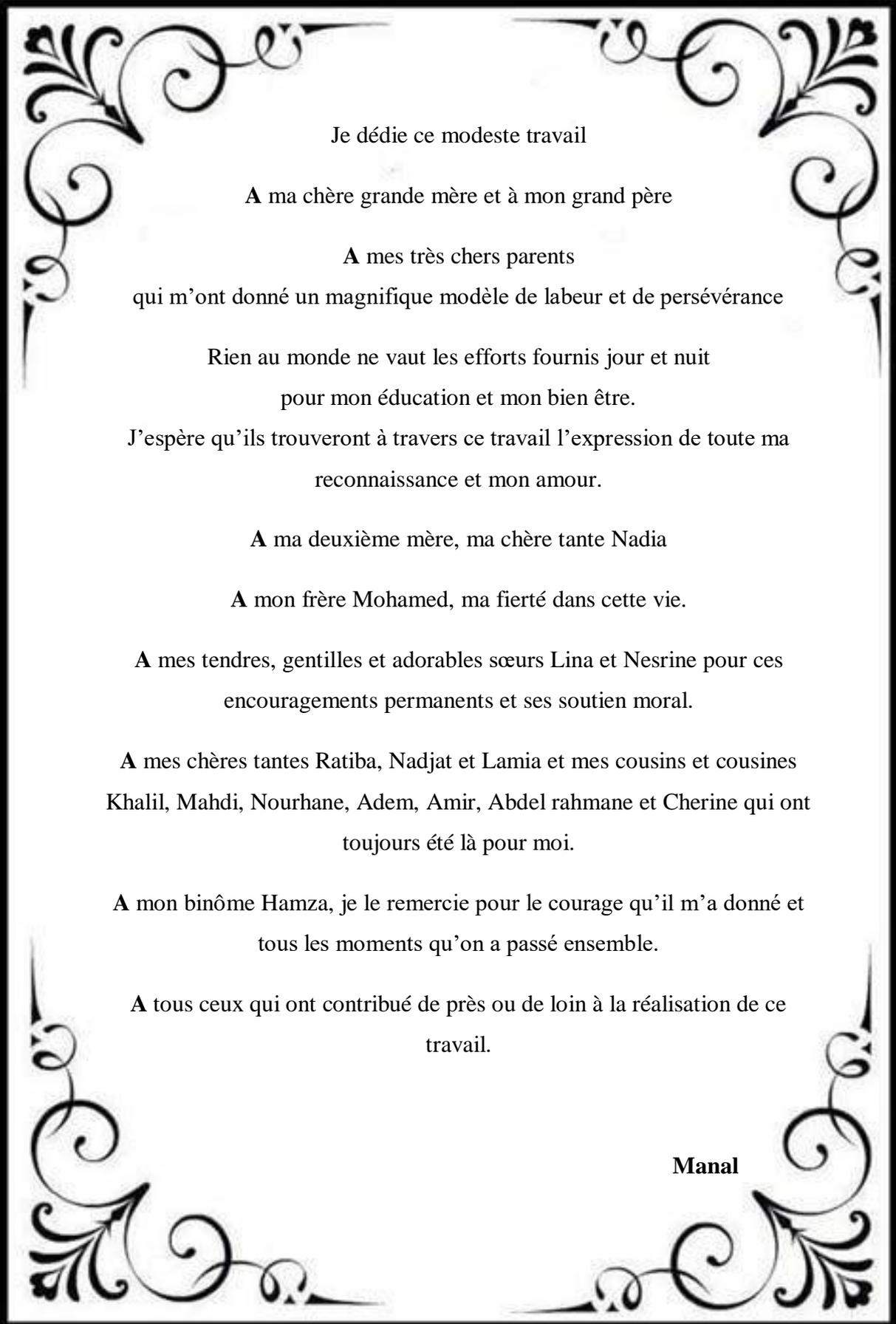
A mes chères amis Abdel djalil, Samir, Chouaib, Hamza, Abdel raouf, Khaier eddine et Ammar je les remercie pour le sourire qu'elles ont su toujours dessiner sur mon visage.

A mon binôme Manal, je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments qu'on a passé ensemble.

A chère tante Zerroud Nadia pour son aide et sa patience.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

**Hamza**

A decorative border with intricate floral and scrollwork patterns in black ink, framing the central text.

Je dédie ce modeste travail

A ma chère grande mère et à mon grand père

A mes très chers parents  
qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit  
pour mon éducation et mon bien être.

J'espère qu'ils trouveront à travers ce travail l'expression de toute ma  
reconnaissance et mon amour.

A ma deuxième mère, ma chère tante Nadia

A mon frère Mohamed, ma fierté dans cette vie.

A mes tendres, gentilles et adorables sœurs Lina et Nesrine pour ces  
encouragements permanents et ses soutien moral.

A mes chères tantes Ratiba, Nadjat et Lamia et mes cousins et cousines  
Khalil, Mahdi, Nourhane, Adem, Amir, Abdel rahmane et Cherine qui ont  
toujours été là pour moi.

A mon binôme Hamza, je le remercie pour le courage qu'il m'a donné et  
tous les moments qu'on a passé ensemble.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce  
travail.

**Manal**

# TABLE DES MATIERES

<b>1. Introduction</b> .....	1
<b>2. Synthèse bibliographique</b> .....	3
2.1. Les bacteries multiresistantes.....	3
2.1.1. Définition.....	3
2.1.2. Les principales BMR.....	3
2.1.2.1. Enterobacteries productrice de B-lactamase à spectre étendu.....	3
2.1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline.....	4
2.1.2.3. Entérocoque résistante à la vancomycine (ERV).....	5
a) <i>P.aeruginosa</i> multirésistant (PAR).....	5
b) <i>A.baumannii</i> multirésistant (ABR).....	6
2.2. La resistance et la multiresistances.....	6
2.2.1. La résistance.....	6
2.2.1.1. La résistance naturelle.....	7
2.2.1.2. La résistance acquise.....	7
2.2.1.3. La résistance croisée.....	7
2.2.1.4. Co-résistance.....	7
2.2.2. La multirésistances.....	8
2.3. Les peptides antimicrobiens.....	8
2.3.1. Définition.....	8
2.3.2. Les propriétés des PAMs.....	9
2.3.3. La structure des peptides antimicrobiens.....	9
2.3.3.1. La structure primaire.....	9
2.3.3.2. La structure secondaire.....	10
2.3.3.3. La structure tertiaire.....	11
2.3.4. L'activité des PAMs.....	11
2.3.5. Usage thérapeutique des peptides antimicrobiens.....	12

2.3.6. La microcine J25 .....	13
2.3.6.1. Définition .....	13
2.3.6.2. La maturation de la Mcc J25.....	14
2.3.6.3. La structure de la Mcc J25 .....	16
2.3.6.4. Le mode d'action de la Mcc J25 .....	19
2.3.6.5. Applications de la Mcc J25.....	21
<b>3. Synthèse méthodologique.....</b>	<b>22</b>
3.1. Origine et conditions de croissance des souches bactériennes utilisées .....	22
3.2. Production et purification de la Mcc J25.....	23
3.2.1. Production de la Mcc J25 .....	23
3.2.2. Purification de la Mcc J25 .....	23
3.3. Détermination de la concentration protéique.....	24
3.4. Evaluation de l'activité antibactérienne de la Mcc J25 .....	24
3.4.1. Méthode de diffusion en gélose .....	24
3.4.2. Méthode de microtitration .....	25
<b>4. Synthèse des résultats at Discussion.....</b>	<b>28</b>
4.1. Production et purification de la Mcc J25.....	28
4.1.1. Production de la Mcc J25 .....	28
4.1.2. Purification de la Mcc J25 .....	29
4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne de la Mcc J25 .....	29
4.2.1. Méthode de diffusion en gélose .....	29
4.2.2. Méthode de microtitration .....	31
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>6. Abstract.....</b>	<b>36</b>
<b>7. الملخص.....</b>	<b>37</b>
<b>8. Références bibliographiques.....</b>	<b>38</b>
<b>9. Annexe.....</b>	<b>52</b>

## *LISTE DES FIGURES*

<b>Figure 1:</b> la structure primaire d'un peptide antimicrobien .....	10
<b>Figure 2:</b> la structure secondaire d'un peptide antimicrobien.....	11
<b>Figure 3 :</b> illustration schématique de la production de la MccJ25.....	13
<b>Figure 4:</b> représentation schématique de la MccJ25 synthétase. ....	15
<b>Figure 5:</b> structure tridimensionnelle de l'homodimère McjD déterminée par diffraction de rayons X et montrée dans le plan de la membrane. ....	15
<b>Figure 6:</b> structure en solution de la MccJ25 déterminée par RMN. ....	16
<b>Figure 7 :</b> structure de la microcine J25 après traitement à la thermolysine.....	17
<b>Figure 8:</b> structure de la liaison de la MccJ25 et du récepteur de sidérophore FhuA chez <i>E. coli</i> déterminée par diffraction de rayons X. PDB :4CU4.....	18
<b>Figure 9:</b> représentation de l'interaction de la MccJ25 (en jaune) avec FhuA chez <i>E. coli</i> ...	18
<b>Figure 10:</b> modèle du complexe de la MccJ25 avec l'ARN polymérase. ....	19
<b>Figure 11:</b> effet de la MccJ25 sur <i>S.typhimurium</i> et de la MccJ25- Th19, la MccJ25 traitée avec la thermolysine, sur <i>S.typhimurium</i> et <i>S.newport</i> sur la consommation d'oxygène.....	20
<b>Figure 12 :</b> schématisation de la méthode de diffusion sur gélose.....	25
<b>Figure 13:</b> détermination de la CMI par dilution successive en milieu liquide (macrodilution). ....	26
<b>Figure 14 :</b> détermination de la CMI par la méthode de microdilution.....	27
<b>Figure 15 :</b> chromatogrammes par HPLC analytique des différentes étapes de purification de la bactériocine. ....	29
<b>Figure 16 :</b> résultats des tests d'activité contre <i>Salmonella enteritidis</i> par diffusion en gélose des différentes étapes de purification de la bactériocine .....	30

***LISTE DES TABLEAUX***

**Tableau 1 :** caractérisation par HPLC de la production de la MccJ25 cyclique..... 14

**Tableau 2:** résultats de production de la MccJ25 à partir d'une culture d'1,5 L d'*E.coli*. .....28

**Tableau 3:** activité antimicrobienne contre *Salmonella enteritidis* en milieu LB des différentes fractions en sortie de colonne Sep-Pak C18 .....31

**Tableau 4:** activité antimicrobienne contre *Salmonella enteritidis* de la MccJ25 au cours des différentes étapes de purification de la bactériocine. ....32

## *LISTE DES ABRÉVIATIONS*

### *A*

**ABR** : *Acinetobacter baumannii* multirésistant.

**ACN** : acétonitrile pure.

**ACSSuT** : resistance to ampicillin chloramphenicol streptomycin sulphonamides and tetracyclines.

**ADP** : adénosine diphosphate.

**ALA** : alanine.

**AMPC** : adénosine monophosphate cyclique.

**AMP-PNP** : adénylyl-imidodiphosphate.

**ARG** : arginine.

**ARNP** : acide ribonucléique polymérase.

**ASP** : aspartate ou acide aspartique

**ATP** : adénosine triphosphate.

**AU** : unité atmosphérique.

### *B*

**BMR** : bactéries multirésistantes.

### *C*

**C3G - C4G** : céphalosporines de troisièmes et quatrièmes générations.

**CMI** : concentration minimale d'inhibition.

## *E*

**EBLSE** : entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu.

**ECDC** : centre européen de contrôle et de prévention des maladies.

**EFSA** : autorité européenne de sécurité alimentaire.

**ERV** : entérocoques résistants à la vancomycine.

**Etc** : et cetera.

## *F*

**FTIR** : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

## *G*

**GLN** : glutamine.

**GLY** : glycine.

**HPLC** : chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression.

## *I*

**ILE** : isoleucine.

**IN** : infections nosocomiales.

## *K*

**Kb** : kilo byte.

## *L*

**LB** : Luria-Bertani.

**LEU** : leucine.

**LYS** : lysine.

## *M*

**Mcc J25** : Microcine J25.

## Liste des abréviations

---

**MET** : méthionine.

**MG** : magnésium.

**MIN** : minute.

**MNHN** : muséum national d'Histoire naturelle.

### *N*

**N** : azote.

**n** : nano

**NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide H<sup>+</sup>.

### *P*

**P** : phosphore.

**PAMs** : peptides antimicrobiens.

**PAR** : *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant.

**PHE** : phénylalanine.

**PI** : phosphate inorganique.

**PLP** : protéines liant les Pénicillines.

**PPi** : pyrophosphate.

### *R*

**RMN** : résonance magnétique nucléaire.

**ROS** : reactive oxygen species.

**RPM** : rotations par minute.

### *S*

**S** : soufre.

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

## Liste des abréviations

---

**SCC** : staphylococcal Cassette Chromosome.

**SER** : sérine.

*T*

**TYR** : tyrosine.

*U*

**UFC** : unité formant colonie.

*V*

**VAL** : valine.

*X*

**XIXe** : 19<sup>ème</sup>

# INTRODUCTION

## 1. Introduction

Depuis des temps immémoriaux, l'homme est en guerre constante avec son ennemi numéro un, les microbes. Les bactéries étaient une menace effrayante pour sa vie et sa santé.

Jusqu'à ce qu'il vienne Louis Pasteur au XIXe siècle et met en évidence la multiplication bactérienne et son implication dans de nombreuses pathologies communes, ainsi que le développement des moyens de lutte contre ces micro-organismes (pasteurisation et autoclave) ainsi que des milieux de culture (Anonyme 1).

Cependant, avec l'utilisation excessive et illégale d'antibiotiques par l'homme, les antibiotiques sont devenus une arme à double tranchant et, malheureusement, le côté négatif a éclipsé la vie humaine. Aujourd'hui, nous avons appris ce qu'on appelle la résistance aux antibiotiques « l'antibiorésistance ».

Malheureusement et selon l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (EFSA) et le Centre européen de contrôle et de prévention des maladies (ECDC) l'antibiorésistance tue environ 25 000 personnes par an en Europe (Anonyme 2).

La résistance aux antibiotiques est causée par l'utilisation aveugle d'antibiotiques, comme le non-respect de la durée ou de la quantité et des conseils d'un autre médecin. Un tel comportement entraîne ce que l'on appelle la pression de la sélection. L'antibiotique tue les bactéries qui ont un faible niveau de résistance et laisse les bactéries qui ont un niveau élevé de résistance. Ces dernières sont appelées : bactéries multirésistantes ou « BMR ».

Selon L'organisation mondiale de la santé (OMS), 700 000 personnes dans le monde meurent actuellement d'agents infectieux multirésistants (notamment la tuberculose) et qu'ils pourraient être responsables en 2050 d'environ 10 millions de morts par an, soit plus que le cancer.

Ces bactéries ont développé de nouveaux mécanismes pour occulter l'effet des antibactériens, les mécanismes sont multiples et rendent de plus en plus inefficaces les thérapeutiques actuelles. Ces résistances ont poussé les différentes institutions de santé à revoir entièrement le système actuel. Il ne s'agit plus de traiter seulement une bactérie, mais de considérer tous les facteurs occasionnant cette résistance. De la découverte des mécanismes de résistance, aux protocoles permettant de limiter la surconsommation des antibiotiques. Ce travail décrit les stratégies

actuelles qui sont utilisées pour lutter contre cette résistance, il s'agit de la recherche des nouvelles thérapeutiques telles que les peptides antimicrobiens.

**SYNTHÈSE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2. Synthèse bibliographique

### 2.1. Les bactéries multirésistantes

#### 2.1.1. Définition

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques (BMR) lorsqu'elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (Jarlier *et al.*, 2010).

De ce fait, la multi résistance conduit à l'impasse thérapeutique, qui combinée à la fréquence élevée des BMR, à leur potentiel pathogène, au risque élevé de diffusion des germes ainsi qu'au transfert relativement aisé de leurs mécanismes de résistance, place la lutte contre les BMR comme une priorité nationale (Anonyme 3).

#### 2.1.2. Les principales BMR

Ces BMR sont représentées principalement par : les entérobactéries productrices de bêta lactamase à spectre élargi (EBLSE), *Acinetobacter baumannii* multirésistant (ABR) (Annex1), *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (PAR) (Annex1), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Annex1), et les Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Blanchète, 2009).

##### 2.1.2.1. Entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamase à spectre étendu (EBLSE)

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif constituant l'une des plus importantes familles de bactéries. Elles regroupent de nombreux genres (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* etc.). Cette famille réunit des bactéries commensales qui résident principalement au niveau du tube digestif. *Escherichia coli* (Annex1) représente à elle seule la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin. Certaines entérobactéries sont pathogènes strictes (ex : *Salmonella typhi* (Annex1) ou *Shigella dysenteria* (Annex1)). D'autres sont, à l'hôpital, responsables des infections opportunistes chez des patients souvent fragilisés. Entérobactéries résistantes aux céphalosporine 3eme génération (C3G) par production de bêta lactamase à spectre étendu Les bêtalactamines demeurent à l'heure actuelle les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité, et à leur pouvoir bactéricide. Cependant, les entérobactéries hébergent naturellement et ont acquis des

résistances limitant leur activité. Ces résistances sont liées principalement à la production des enzymes inactivatrices appelées bêta lactamases mais peuvent.

- Le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux bêtalactamines. Elle est observée naturellement dans la plupart des espèces. L'expansion de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième et quatrième générations (C3G/C4G) constitue probablement l'un des faits les plus marquants des deux dernières décennies en matière d'antibiorésistance. Cette résistance est principalement assurée par la production des BLSE et dans une moindre mesure de céphalosporines plasmidiques (adénosine monophosphate cyclique) "AmpC". Ces enzymes confèrent une résistance élevée à la plupart des bêtalactamines thérapeutiques, à l'exception notable des carbapénèmes. Leurs gènes, principalement localisés sur des plasmides, diffusent très facilement entre les bactéries (Sanders, 1991 ; Bush, 1996).

### **2.1.2.2. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)**

*S.aureus* est une des deux principales espèces responsables d'infection nosocomiale. Le développement incontrôlé des épidémies de SARM et les preuves répétées de leur diffusion clonale justifient à eux seuls la mise en place d'un programme de lutte contre les BMR. Les SARM représentent 5 à 10% des bactéries isolées des infections nosocomiales (IN), ils sont résistants à toutes les  $\beta$ -lactamines et très souvent résistants aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones (Vincent, 2000).

- Les risques liés au SARM en milieu hospitalier : le SARM peut pénétrer dans le sang ou dans les tissus à diverses occasions, notamment lors de procédures invasives telles que les interventions chirurgicales, les injections, la ventilation. Il peut alors provoquer une infection cutanée locale ou des pathologies bien plus graves telles qu'une pneumonie, une septicémie ou une infection du site d'opérateur.
- Le SARM se transmet principalement par contact direct d'une personne à une autre ou via des équipements ou des dispositifs médicaux contaminés. La prise d'antibiotiques est également associée à un risque plus élevé de contamination par le SARM (Boyce *et al.*, 1997).

La résistance à la Métilcilline chez le *S.aureus* est en effet liée à une modification de la cible de l'antibiotique par acquisition d'une protéine liant les pénicillines (PLP 2a), de très faible

affinité pour les pénicillines M et les autres bêtalactamines. Cette PLP supplémentaire est codée par un gène très conservé « mec A » qui fait partie d'un élément génétique mobile appelé

« Staphylococcal Cassette Chromosome » (SCC mec) intégré dans le chromosome. La Méricillino-résistance traduit une résistance à toutes les bêtalactamines y compris aux Céphalosporines de 3ème génération et à l'Imipénème. ET souvent associée à une résistance aux aminosides, macrolides et apparentés, synergistines et aux fluoroquinolones (Leclercq, 2002 ; Poirel *et al.*, 2006).

### 2.1.2.3. Entérocoque résistante à la vancomycine (ERV)

On retrouve principalement :

#### a) *P.aeruginosa* multirésistant (PAR)

- *P.aeruginosa*, bacille Gram négatif, est un germe pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales et communautaires, il est ubiquitaire, saprophyte et se développe dans un environnement humide, mais aussi potentiellement dans les solutions aqueuses, les équipements de la ventilation mécanique, les nébulisateurs ...etc. Par ailleurs, la transmission entre patients ou manuporté par le biais des soins qui leur sont prodigués est un facteur non négligeable (Pool, 2005 ; Soussy, 2007 ; Gildas *et al.*, 2013 ; Hortense *et al.*, 2015).
- *P.aeruginosa* est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques (aminopénicillines, les céphalosporines de 3ème génération, l'ertapénème, la kanamycine, les tétracyclines) , mais les résistances acquises sont fréquentes et favorisées par la pression de sélection de l'antibiothérapie. Certains mécanismes de résistance aux bêtalactamines sont connus depuis longtemps (production de pénicillinase, hyperproduction de la céphalosporinase) et d'autres ont été récemment identifiés : il s'agit de systèmes d'efflux actif, conférant une résistance croisée aux quinolones (Soussy, 2007 ; Fraude *et al.*, 2007 ; Bricha *et al.*, 2009).
- La résistance à l'imipénème et au méropénème est due soit à une perte de la porine OprD ou d'une production de carbapénémases (Fraude *et al.*, 2007).

**b) *A.baumannii* multirésistant (ABR)**

- *A.baumannii* est un bacille Gram négatif, aérobic, non fermenteur, immobile, encapsulé et non sporulé, Ce sont des bactéries ubiquitaires pouvant être isolées à partir de l'homme, du sol et de l'eau (Lambert, 1997 ; Anonyme 4 ; Zahar *et al.*, 2018).
- *baumannii* est un pathogène opportuniste qui peut être responsable d'infections sévères malgré sa faible virulence, en particulier chez les patients immunodéprimés (Vincent, 2004). Les infections les plus fréquentes à cette bactérie sont l'infection urinaire et respiratoire (Dinges *et al.*, 2000).
- *baumannii* est naturellement résistant à plusieurs bêtalactamines; les aminopénicillines, les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération et de 2<sup>-ème</sup> génération ainsi que l'ertapénème; du fait de l'association de différents mécanismes impliquant les bêta-lactamases, efflux et imperméabilité.
- *baumannii* produit naturellement deux types de bêta-lactamases, une céphalosporinase ou bêta-lactamase de la classe C de Ambler (également dénommée AmpC) et une oxacillinase ou bêta-lactamase de classe D (Edouard *et al.*, 2006 ; Patwardhan *et al.*, 2008).

## **2.2. La résistance et la multi résistances**

### **2.2.1. La résistance**

La progression de la résistance bactérienne aux antibiotiques cause des infections difficiles à traiter et pose un problème de santé publique. Les bactéries résistantes sont souvent la cause des infections nosocomiales aggravant le pronostic des malades, prolongent leur hospitalisation et augmentent les coûts de traitement. Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres bactéries de la même espèce.

On distingue deux types de résistance bactérienne. La résistance naturelle et la résistance acquise.

### **2.2.1.1. La résistance naturelle**

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Pour chaque classe d'antibiotique (Mehdi, 2008). Par exemple, les quinolones de première génération sont inactives sur les bactéries à Gram positif. La résistance naturelle est transmise uniquement à la descendance. Elle n'est donc pas transmissible sur le mode horizontal d'une bactérie à l'autre ou entre espèces différentes (Lozniewski *et al.*, 2010).

### **2.2.1.2. La résistance acquise**

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (Mehdi, 2008).

### **2.2.1.3. La résistance croisée**

La résistance croisée est un phénomène par lequel une bactérie qui a développé une résistance à l'un des antibiotiques d'une classe devient aussi résistante aux autres membres de la même classe. Cela même si elle n'a jamais été exposée à ces molécules. C'est cette résistance croisée qui permet aux  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) présentes chez les bactéries à Gram négatifs d'avoir une résistance si étendue ( $\beta$ -lactamines et céphalosporines) à tel point qu'elles deviennent un véritable enjeu en santé humaine (Julie, 2014).

### **2.2.1.4. La Co-résistance**

Plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun des mécanismes confère par résistance croisée la résistance à un groupe d'antibiotique conférant à la bactérie un large spectre de résistance (Stéphanie, 2009).

### **2.2.2. La multi résistance**

La définition de la multi résistance est difficile à établir. Il est couramment admis de parler de multi résistance lorsqu'une souche bactérienne a accumulé sur son profil sauvage de sensibilité aux antibiotiques des résistances acquises telles que la souche ne reste sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (résistance à plus de trois familles d'antibiotiques différentes) (Cattoen, 2015).

Les scientifiques ont découvert par la suite que les gènes de résistance étaient facilement capturés, disséminés et échangés d'une bactérie à l'autre par un système de "couper/coller" génétique de structures contenant ces gènes, appelées intégrons. Mais la dynamique de ces échanges, qui conditionne le développement des multi résistances chez les bactéries, restait inexplicée (Leclercq, 2002).

### **2.3. Les peptides antimicrobiens**

Il est essentiel que nous trouvions des alternatives aux antibiotiques. Comme souvent, ces alternatives peuvent prendre leur source dans la nature qui nous entoure. En effet, il existe par exemple des pathogènes qui s'attaquent aux bactéries, les phages, dont l'utilisation en médecine s'étend. De plus, les organismes vivants ont développé de nombreux moyens de combattre les bactéries. Parmi ces armes se trouvent les peptides antimicrobiens.

#### **2.3.1. Définition**

Les peptides antimicrobiens (PAMs), également appelés « Host défense peptides », sont de petites molécules de taille et de structure variables (5 à 50 aminoacides) qui interviennent dans la réponse immunitaire innée de nombreux organismes vivants, et constituent ainsi leur première ligne de défense contre les agressions. Ils sont généralement cationiques, à caractère amphipatique et sont conservés dans le règne animal et végétal. En effet, les PAMs sont retrouvés aussi bien chez les plantes, les bactéries, les insectes et les vertébrés. A la différence des antibiotiques, ils exercent leur action microbicide sur un large spectre de pathogènes qui inclut les bactéries (gram+ et gram-), les champignons et levures, les parasites mais aussi les virus. Les PAMs ont pour fonction première l'élimination directe de pathogènes en induisant la déstabilisation structurale de leur membrane puis la mort de ceux-ci. Cependant, nombre

d'entre eux sont maintenant connus pour exercer, en plus de leur fonction microbicide directe, un rôle modulateur de la réponse immunitaire à plusieurs niveaux (Rogers, 1928).

### **2.3.2. Les propriétés des PAMs**

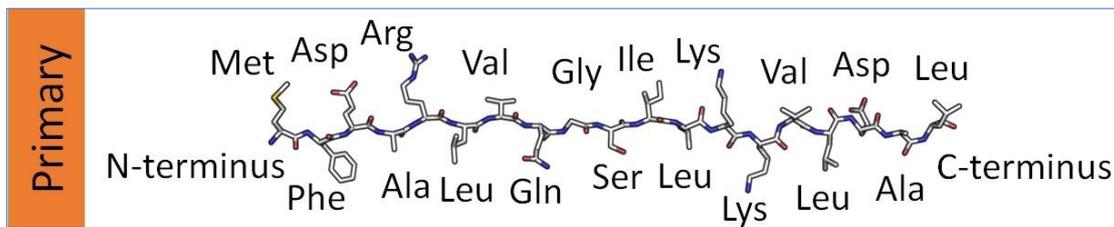
- Ils sont relativement courts <100 résidus d'acides aminés (Diamond *et al.*, 2009 ; LAI *et al.*, 2009).
- Ils sont chargés positivement (arginine, lysine, histidine...)
- Ils sont amphiphiles (Powers *et al.*, 2003 ; Andres *et al.*, 2007).
- Ils présentent une diversité de structure modulaire en fonction de leurs propriétés structurelles
- Ils s'associent à des membranes, caractéristique spécifique des PAMs (Jenssen *et al.*, 2006).
- Ils présentent une activité antimicrobienne en dépit de la différence de structure et une myriade de séquences intégrant à la fois les acides aminés naturels et non naturels (Bellomio *et al.*, 2004)

### **2.3.3. La structure des PAMs**

Les peptides antimicrobiens constituent un groupe unique et diversifié de molécules, qui sont divisées en sous-groupes sur la base de leur composition et de leur structure en acides aminés. Les peptides antimicrobiens contiennent généralement entre 12 et 50 acides aminés. Ces peptides incluent deux résidus chargés positivement ou plus fournis par l'arginine, la lysine ou, dans les environnements acides, l'histidine et une proportion importante de résidus hydrophobes (Powers *et al.*, 2003).

#### **2.3.3.1. La structure primaire**

C'est la séquence en acide aminé. Par convention, elle se définit de l'extrémité azotée N-terminal à l'extrémité carboxyle C-terminal. Cette séquence est linéaire, les AA la composant peuvent ainsi interagir entre eux et former des structures secondaires plus complexes (Pauling *et al.*, 1951).

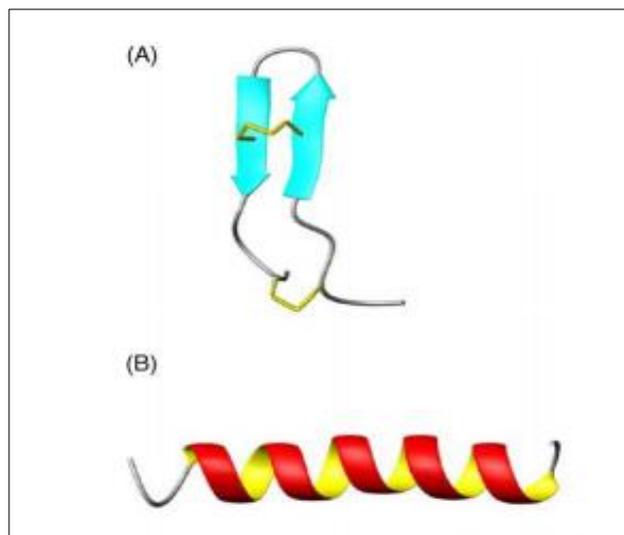


**Figure 1** : la structure primaire d'un peptide antimicrobien.

### 2.3.3.2. La structure secondaire

Peut se décrire sous deux formes :

- L'hélice  $\alpha$  (figure 2 B), constituée d'une chaîne principale enroulée permettant des liaisons H entre les résidus d'AA (Pauling *et al.*, 1951). Le caractère amphiphile des peptides vient du fait que les résidus hydrophobes s'assemblent d'un côté et les résidus hydrophiles de l'autre. L'hélice  $\alpha$  est très polarisée du fait que toutes les liaisons hydrogènes sont parallèles : N-terminal anionique et C-terminal cationique (Zasloff, 1987).
- Le feuillet  $\beta$  (figure 2 A) est une structure où la chaîne de résidus est repliée sur elle-même de façon parallèle ou antiparallèle, et stabilisée par des liaisons hydrogènes maintenant la structure. En raison des polarités, les assemblages antiparallèles sont plus stables. La structure en coude peut s'apparenter à une structure secondaire particulière.
- Il s'agit en fait d'un repliement particulier du squelette carboné. Le plus souvent, le coude relie deux structures secondaires (hélices ou brins) (Brändén et Tooze, 1996). La structure secondaire des peptides antimicrobiens (PAM) est considérée comme un point important dans la compréhension du mode de fonctionnement de ces derniers.



**Figure 2** : la structure secondaire des peptides antimicrobiens (Powers *et al.*, 2003). (A) : la tachyplesine ; (B) : la magainine-2. En jaune : les ponts disulfures.

### 2.3.3.3. La structure tertiaire

Correspond au repliement de la chaîne protéique. Ces repliements sont liés à l'existence de résidus encombrants ou chargés. Cette structure est stabilisée par :

- Des liaisons hydrogène entre les résidus d'acides aminés (exemple : serine --- lysine)
- Des liaisons ioniques (exemple : aspartique ---lysine) ;
- Des liaisons hydrophobes (ou Van der Waals) entre les résidus apolaires ;
- Des ponts disulfures entre les résidus de cystéine.

La structure tridimensionnelle d'un peptide est intimement liée à sa fonction : si la structure est cassée (par l'emploi d'un agent dénaturant par exemple), le peptide perd sa fonction, il est dénaturé. L'analyse de la structure globale des PAM se fait surtout grâce à des techniques de basse résolution comme dichroïsme circulaire ou Transformée de Fourier (FTIR) (Powers *et al.*, 2003 ; Gottler *et al.*, 2009).

### 2.3.4. L'activité des PAMs

*In vitro*, la plupart des PAM sont actifs contre différents types d'organismes, comme les bactéries à Gram positif et négatif, les protozoaires, les champignons filamenteux mais aussi certains virus enveloppés (Zaslhoff, 1987 ; Powers *et al.*, 2003 ; LAI *et al.*, 2009).

Les PAM ont donc un spectre d'activité antimicrobienne très large (Powers *et al.*, 2003).

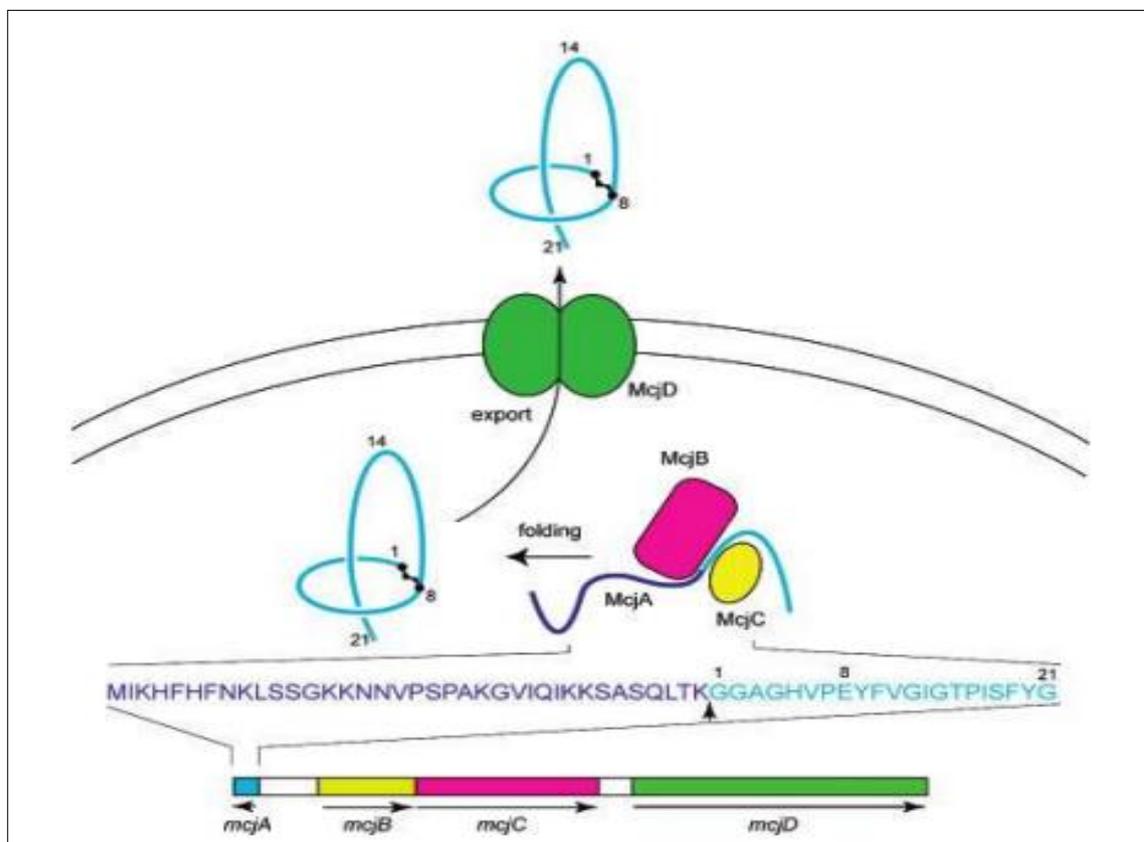
### **2.3.5. Usage thérapeutique des peptides antimicrobiens**

- Très peu de peptides antimicrobiens sont actuellement sur le marché (Vincent *et al.*, 2004). La colistine et de la poly myxine B qui sont utilisées comme agents antibactériens en aérosols ou de manière intraveineuse pour traiter des infections complexes et résistantes à d'autres traitements.
- De nombreux peptides antimicrobiens sont en phase de développement clinique (Yu *et al.*, 2019) mais pour une grande majorité dans des applications superficielles, dans des pommades ou des sprays.
- Une autre approche investiguée consiste à stimuler chimiquement le système immunitaire du patient pour que celui-ci augmente sa production endogène de peptides antimicrobiens ce qui aide à combattre efficacement des infections (Yu *et al.*, 2019).

## 2.3.6. La microcine j25

### 2.3.6.1. Définition

La MccJ25 est une bactériocine unique, ayant une structure particulière tout comme son mode d'action. Composée de 21 acides aminés, elle fait partie des peptides lasso ayant une grande résistance à la lyse enzymatique et est active contre plusieurs organismes pathogènes, dont certaines souches d'*Escherichia*, *Salmonella* et *Shigella*. Ces caractéristiques démontrent tout le potentiel de la MccJ25 comme agent de préservation alimentaire (Pomares *et al.*, 2009).



**Figure 3** : illustration schématique de la production de la MccJ25 par le plasmide pTUC100. Comportant quatre gènes : mcjA (bleu), mcjB (jaune), mcjC (rose), mcjD (vert). Les gènes codent pour le précurseur de la MccJ25 (McjA), les enzymes de maturation (McjB et McjC) et la protéine de sécrétion (McjD) (Rosengren *et al.*, 2004).

### 2.3.6.2. La maturation de la MccJ25

La production de la MccJ25 se fait à l'aide du plasmide pTUC100 de 4,8 kb comportant les quatre gènes *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* et *mcjD* (Rosengren *et al.*, 2004) chez la cellule productrice de la famille des Enterobacteriaceae (Figure 3) (D. Destoumieux-Garzon, et al. 2002). La production de la MccJ25 est régulée par le début de l'approche de la phase stationnaire et aussi par la concentration en fer dans le milieu.

#### ➤ **McjA**

Le gène *mcjA* code pour le peptide McjA comportant 58 acides aminés, le précurseur de la MccJ25. La microcine J25 représente les acides aminés de la glycine 37 à la glycine 58 de McjA. Le peptide de tête, ou encore peptide guide de 37 acides aminés, est très important pour la maturation et l'activité du peptide final, car son absence réduit grandement la production de la MccJ25 mature (Tableau 1).

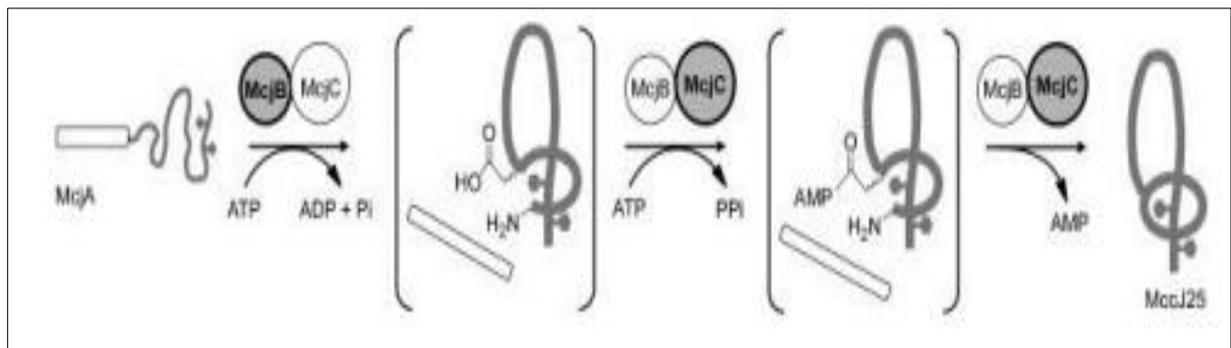
**Tableau 1** : caractérisation par chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression (HPLC) de la production de la MccJ25 cyclique en fonction de la présence ou non du peptide guide par rapport à la MccJ25 linéaire (I-MccJ25) (Yan *et al.*, 2012).

Substrats	Enzymes utilisés	Aire sous la courbe des produits (aire sous la courbe HPLC)	
		I-MccJ25	MccJ25
McjA	McjB+McjC	38243	365896
guide + MccJ25	McjB+McjC	n.a.	2330
I-MccJ25	McjB+McjC	n.a.	748

➤ Plus le chiffre est élevé, plus la production du produit est importante.

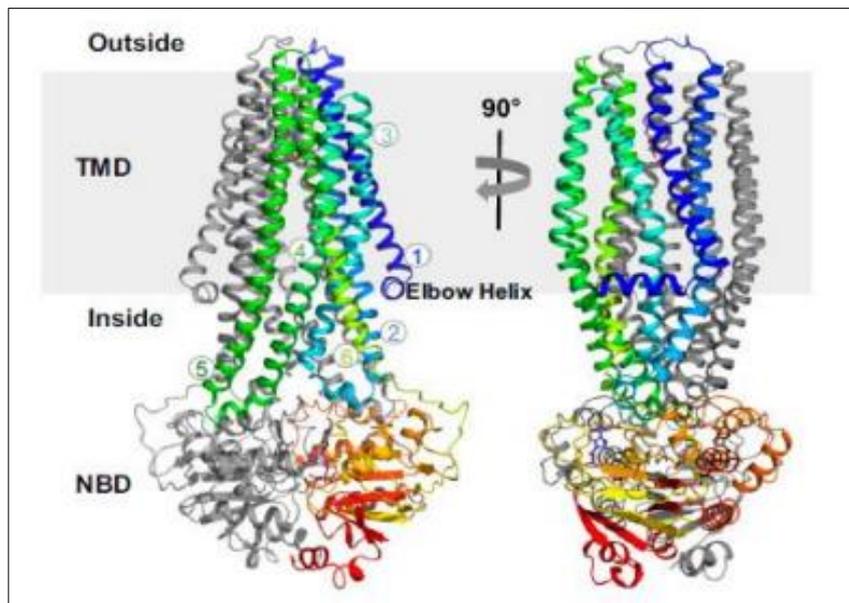
➤ **McjB et McjC**

Ces deux enzymes sont absolument nécessaires à la maturation de la MccJ25 (Figure 4). McjA arrive premièrement à McjB, ou le peptide de tête se fera détacher de la MccJ25 linéaire, puis la McjC formera le lien amide pour la cyclisation.



**Figure 4 :** représentation schématique de la MccJ25 synthétase. Le peptide de tête est représenté par le rectangle vide ; l'enzyme fonctionnelle à chaque étape est indiquée en gris (Yan *et al.*, 2012).

➤ **McjD**



**Figure 5 :** structure tridimensionnelle de l'homodimère McjD déterminée par diffraction de rayons X et montrée dans le plan de la membrane. La membrane est montrée en gris. Les hélices d'une sous-unité sont numérotées. Les liens AMP-PNP sont indiqués en bâtonnets (Choudhury *et al.*, 2014). PDB :4PL

Cette dernière protéine est un transporteur membranaire de type ABC qui transporte la MccJ25 vers l'extérieur de la cellule à l'aide d'ATP (Figure 5). MccJ25 est donc utile à la fois pour relarguer la MccJ25 vers les autres bactéries, mais aussi comme protéine de résistance à la MccJ25 en exportant constamment cette dernière à l'extérieur de la cellule pour que la concentration à l'intérieur de celle-ci ne soit pas critique (Solbiati *et al.*, 1999 ; Choudhury *et al.*, 2014).

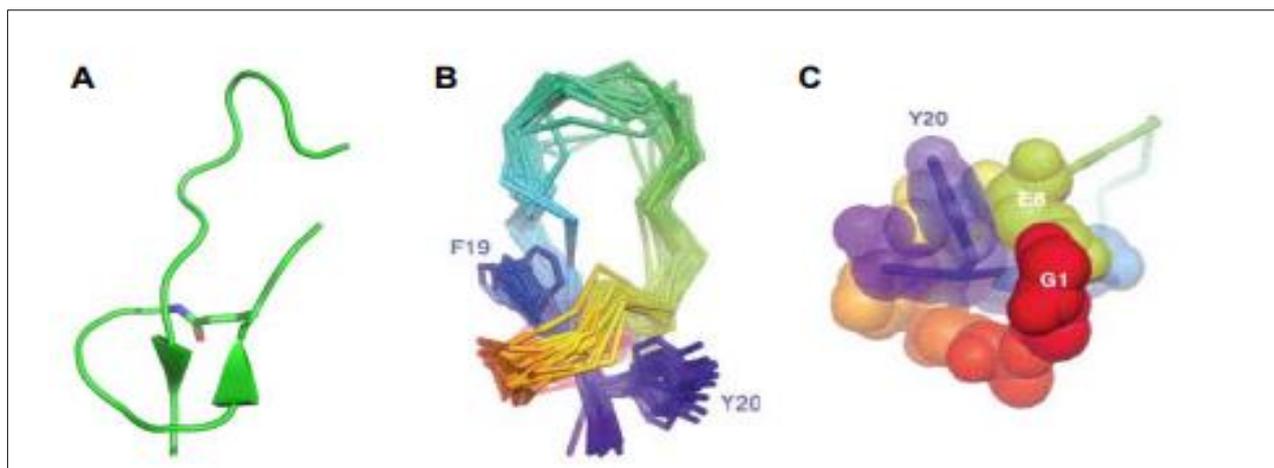
### 2.3.6.3. Structure de la MccJ25

La structure de la MccJ25 est caractéristique des peptides lassos (Figure 6). Elle est constituée de la chaîne d'acides aminés " GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG ". Les huit premiers acides aminés forment un cycle via la formation d'un lien amide entre l'amine libre de la glycine en N-terminal, une fois que le peptide de tête est libéré, et l'acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide glutamique. La partie C-terminale passe au travers de cette boucle et est bloqué par la phénylalanine 19 et la tyrosine 20 qui se trouve de part et d'autre de cette dernière (Wilson *et al.*, 2003 ; Bellomio *et al.*, 2004).



**Figure 6** : structure en solution de la MccJ25 déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN). Dont la F19, la Y20 et le pont entre le G1 et E8 représentés en bâtonnets. PDB :1Q71

- Cette structure particulière lui permet une grande rigidité conformationnelle pouvant supporter des grandes températures comme le passage dans un autoclave sans perdre d'activité (Blond *et al.*, 2002) ainsi qu'une grande résistance à la lyse enzymatique (Blond *et al.*, 1999).

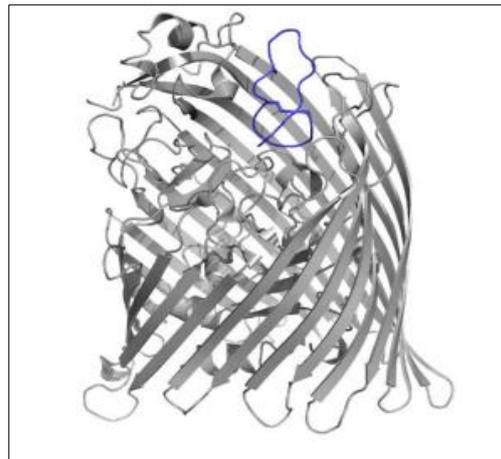


**Figure 7** : structure de la microcine J25 après traitement à la thermolysine. (A) Structure déterminée par RMN en solution. PDB :1S7P ; (B) Ensemble de 20 structures calculées à partir de la RMN en solution montrant le squelette du peptide, ainsi que les chaînes latérales E8, F19 et Y20 (Wilson *et al.*, 2003) ; (C) L’anneau et la queue en représentation CPK (Corey, Pauling et Koltun) dont les sphères représentent le diamètre des atomes montrant l’encombrement stérique du peptide lasso (Wilson *et al.*, 2003).

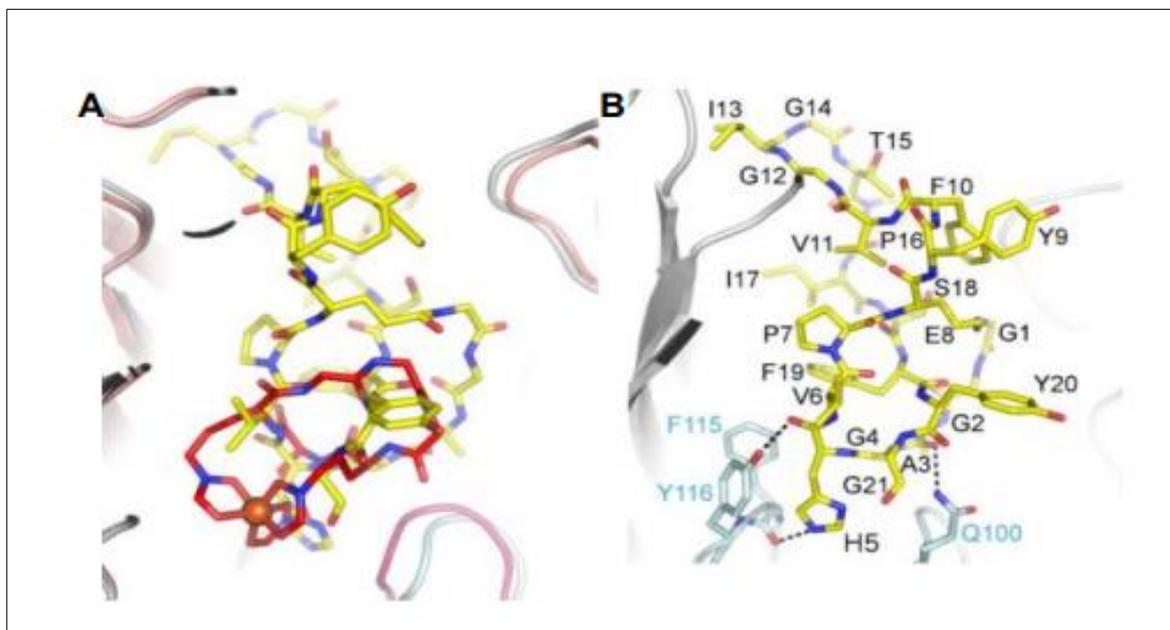
- La thermolysine, une endopeptidase, peut couper la MccJ25 (Figure 7).

Cependant, la structure qui n’est plus reliée en lasso devient un rotaxane, c’est-à-dire un macrocycle lié mécaniquement à un fragment linéaire qui le traverse de part et d’autre, ne pouvant se dissocier en raison de l’encombrement stérique exercé par le diamètre du macrocycle et les cycles aromatiques de la Phe19 et la Tyr20 dans le cas de la MccJ25.

- Comme la cible principale de la MccJ25, l’ARN polymérase, est intracellulaire, cette étude a permis de mettre en évidence l’importance de la boucle formée par le lasso pour l’incorporation du peptide à l’intérieur des cellules cibles. *In vivo*, ce traitement lui fait perdre toute activité antibactérienne. Par contre, lorsqu’elle est testée *in vitro* avec l’ARN polymérase, elle conserve son activité (Semenova *et al.*, 2005). La structure de la MccJ25 lui permet de passer à travers les deux membranes des bactéries à Gram négatifs. Pour entrer à l’intérieur de la cellule cible, la MccJ25 utilise le sidérophore FhuA de la membrane externe (Figures 8 et 9) (Salomon *et al.*, 1993) et la protéine membranaire SbmA de la membrane interne (Salomon *et al.*, 1995).



**Figure 8 :** structure de la liaison de la MccJ25 (bleu) et du récepteur de sidérophore FhuA (gris) chez *E.coli* déterminée par diffraction de rayons X. PDB :4CU4



**Figure 9 :** représentation de l'interaction de la MccJ25 (en jaune) avec FhuA chez *E.coli*. (A) La MccJ25 mime la liaison au ferriochrome (bâtonnets rouges et le fer est représenté par une sphère orange) ; (B) La MccJ25 fait 3 liaisons hydrogènes avec le domaine de liaison (Mathavan *et al.*, 2014).

- Il a été récemment démontré que la MccJ25 peut entrer à l'intérieur des cellules cibles indépendamment de FhuA et SbmA en utilisant un peptide perméabilisateur de membrane telle que (KFF)3K, pouvant ainsi permettre de sensibiliser les souches résistantes à la MccJ25 (Pomares *et al.*, 2013).

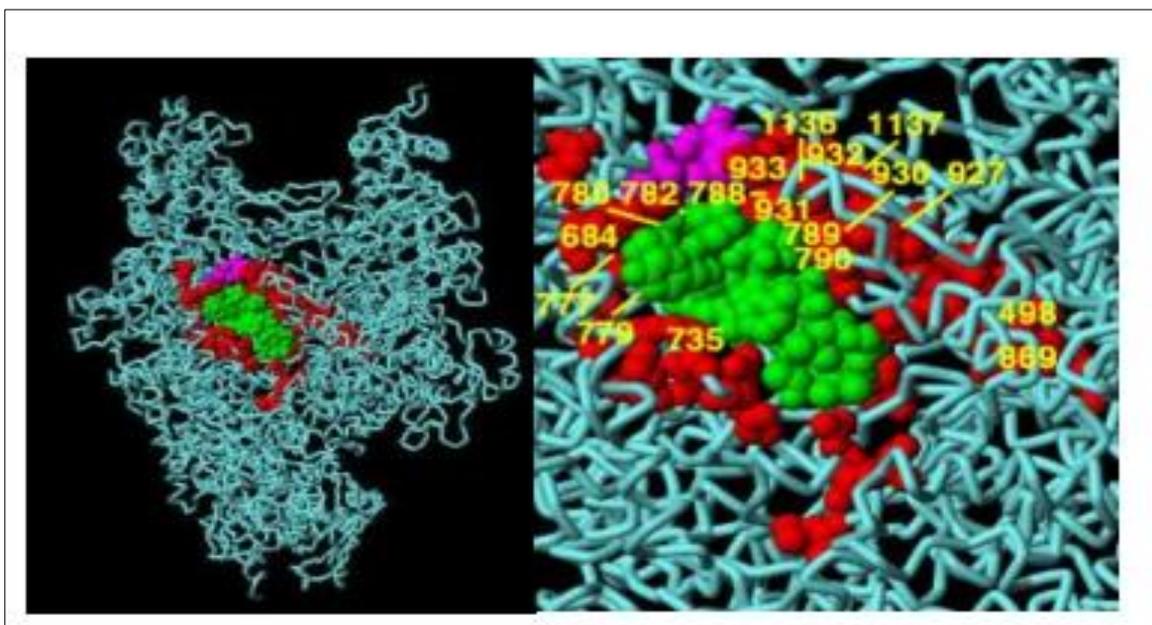
#### 2.3.6.4. Modes d'action de la MccJ25

- Elles ont une activité antibactérienne puissante, associées à un spectre étroit de cibles bactériennes avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) dans la gamme nanomolaire (Galván *et al.*, 2018) à micromolaire lorsqu'il est testé dans des milieux artificiels ou des systèmes tampons *in vitro* (Lopez *et al.*, 2000).
- Ils sont considérés comme des armes efficaces du microbiote intestinal, par des entérobactéries concurrentes. Et donc des conservateurs des aliments ou pour le remplacement des antibiotiques conventionnels (Duquesne *et al.*, 2007).
- MccJ25 était montré être bactéricide contre les souches de *E.coli* et *S.enterica* sérovars Enteritidis et Paratyphi (Duquesne *et al.*, 2007), aussi Elle a plusieurs cibles dans les bactéries sensibles, l'ARN polymérase (Galván *et al.*, 2018).

- Elle agit selon deux modes d'action

##### a) Inhibition de l'ARN polymérase

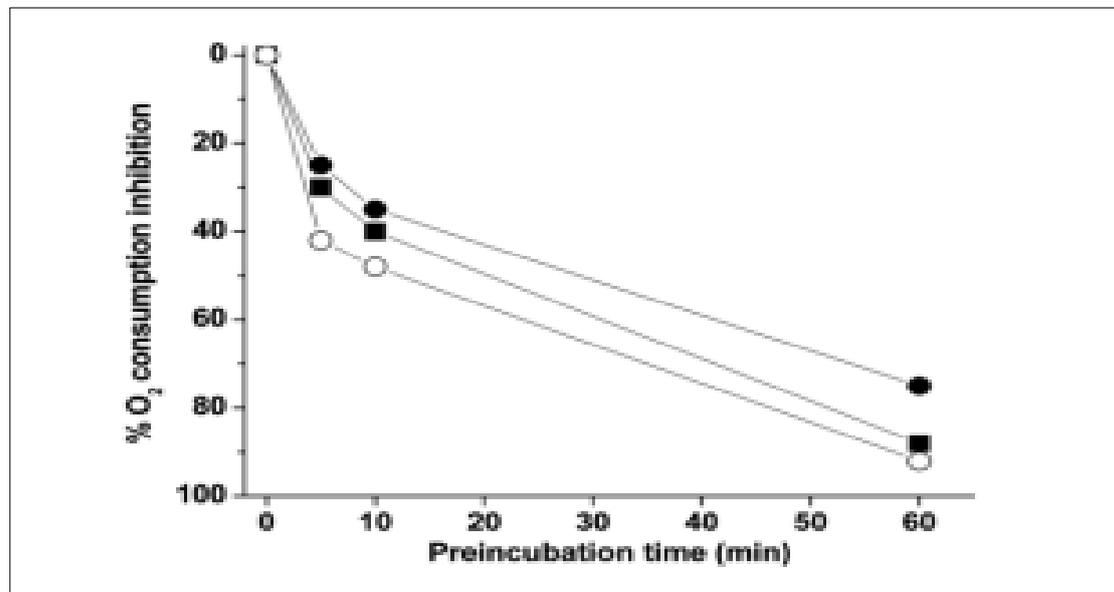
Elle inhibe la transcription en obstruant le canal secondaire de l'ARN polymérase (Taale *et al.*, 2016).



**Figure 10** : modèle du complexe de la MccJ25 avec l'ARN polymérase. La MccJ25 (en vert), l'ARN polymérase en tubes blancs et les sites de mutation qui confèrent de la résistance à la MccJ25 (en rouge et rose) (Mukhopadhyay *et al.*, 2004).

## b) Inhibition de la chaîne respiratoire

La Microcine J25 inhibe les Enzymes de respiration tel que le NADH, succinate déshydrogénase, Lactate déshydrogénase et aussi modifié le taux de consommation d'oxygène et augmente la production de superoxyde (Taale *et al.*, 2016).



**Figure 11** : effet de la MccJ25 sur *S.typhimurium* (pGC01) (points blancs) et de la MccJ25- Th19, la MccJ25 traitée avec la thermolysine, sur *S.typhimurium* (pGC01) (points noirs) et *S.newport* (carrés) sur la consommation d'oxygène (Bellomio *et al.*, 2004).

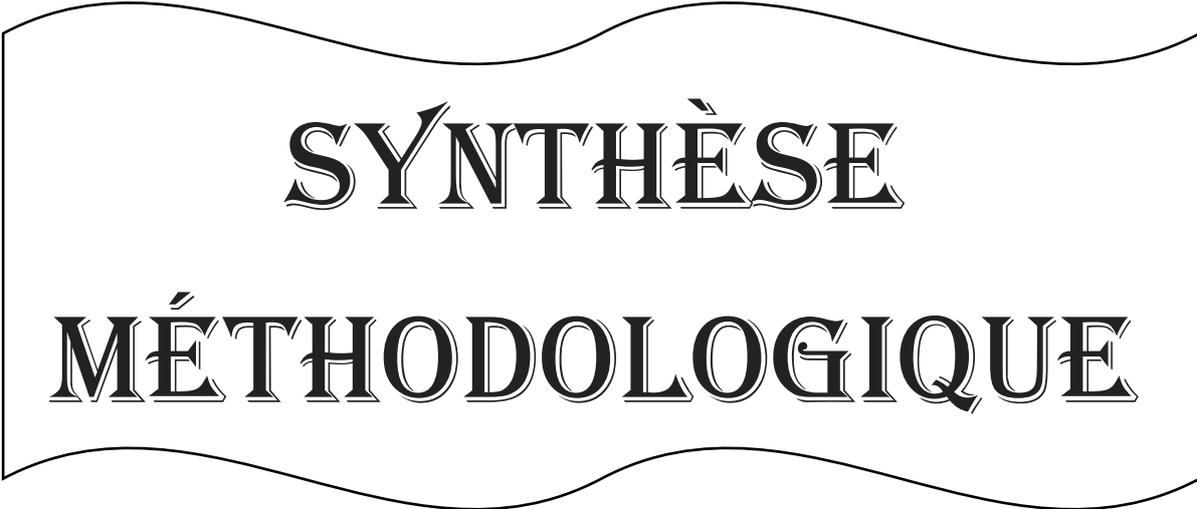
- Le peptide couvre le canal secondaire RNAP, empêchant l'entrée des précurseurs ribonucléotidiques au site actif de l'enzyme aussi elle a un mode d'action indépendant en raison d'une production accrue des (ROS) qui jouent un rôle majeur dans la médiation de la dysfonction mitochondriale (déclenche l'ouverture du pore de transition mitochondriale) induite par MccJ25 (Galván *et al.*, 2018)

### 2.3.6.5. Applications des microcines

Elles sont considérées comme des armes efficaces du microbiote intestinal, contribuant au contrôle d'un éventuel déséquilibre causé par des entérobactéries concurrentes tel que salmonella et *E.coli*.

L'activité puissante exercée par les microcines, associée à un spectre étroit de cibles bactériennes, en font des outils particulièrement intéressants pour les applications en conservation des aliments ou pour le remplacement des antibiotiques conventionnels, ainsi que des agents antitumoraux (Duquesne *et al.*, 2007).

- pour la microcine j25, la principale importance est l'inhibition de la croissance de Salmonella pathogène et d'Escherichia O157 : H7 dans l'intestin de volaille (Duarte *et al.*, 2001).



**SYNTHÈSE**  
**MÉTHODOLOGIQUE**

### 3. Synthèse méthodologique

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance et le pouvoir antibactérien du peptide appelé microcine J25 (MccJ25) sur les entérobactéries en vue de son utilisation comme alternative aux antibiotiques aussi bien chez l'animal que chez l'humain.

Quelques travaux répondant à cet objectif ont été utilisés en l'occurrence : (Reinberg *et al.*, 2015 ; Naimi *et al.*, 2018 ; Naimi *et al.*, 2020). Ces auteurs se sont intéressés à produire et à purifier la MccJ25 à partir de différentes souches d'*Escherichia coli* afin d'évaluer son pouvoir inhibiteur sur certaines entérobactéries multirésistantes appartenant aux genres *Salmonella*, *Shigella* et *E. coli*.

#### 3.1. Origine et conditions de croissance des souches bactériennes utilisées

Dans la présente étude, la bactérie utilisée pour la production de la Microcine J25 (MccJ25) est celle d'*Escherichia coli* K-12 MC4100. Cette dernière provient du « laboratoire de chimie et de biochimie des substances naturelles, Museum national d'histoire naturelle, Paris, France » Elle porte le système génétique de biosynthèse du peptide antimicrobien et confère une résistance au chloramphénicol. Le milieu de culture et la température d'incubation utilisés pour *E. coli* sont Luria-Bertani liquide (LB Broth) additionné à 34 µg/ml de chloramphénicol et 37°C respectivement.

Cependant, *Salmonella enterica subsp* (Annex1). *Entericaenteritidis* (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris) a été utilisée dans les tests d'activité antibactérienne comme étant souche sensible à la MccJ25. *Salmonella* a été cultivée aussi dans le bouillon LB (Difco) mais en l'absence du chloramphénicol avec une température d'incubation égale à 37°C.

Les souches en question ont été préalablement repiquées 3 fois avant leur utilisation afin de s'assurer de leur pureté.

## **3.2. Production et purification de la MccJ25**

### **3.2.1. Production de la Mcc J25 par *E.coli***

Le bouillon LB contenant la souche *E.coli* jeune, a servi à inoculer à 2 % 1,5 L du milieu minimum M63 (Miller, 1972). Ce dernier est composé de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g/L), acides casaminiques (1g/L), solution de MgSO<sub>4</sub> filtrée (20 %), solution de glucose filtrée (20 %), solution de thiamine filtrée (1 g/L). La culture résultante a été incubée à 37°C pendant une nuit sous agitation permanente égale à 150 rpm. Une centrifugation à 8000 g pendant 20 minutes à 4°C a été appliquée sur la culture afin de récupérer la MccJ25 à partir du surnageant.

### **3.2.2. Purification de la MccJ25**

L'extraction de la MccJ25 a été réalisée à partir du surnageant de culture bactérien (M63ensemencé par *E.coli*) selon la méthode de Blond et al (Blond *et al.*, 1999). Pour ce faire, le surnageant de culture a été introduit dans une cartouche de phase inverse C<sub>18</sub> (Sep-Pak C<sub>18</sub> 35 cc, Waters) conditionnée avec 200 ml de méthanol, 200 ml d'acétonitrile pure (ACN) et enfin 200 ml d'H<sub>2</sub>O ultra-pure additionnée de 0,1 % d'acide formique (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Après chargement du surnageant, la cartouche a subi un rinçage avec 200 ml d'H<sub>2</sub>O/0,1 % CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'élution de la MccJ25 a été effectuée en variant la teneur en ACN (de 10 % à 40 %) de la phase mobile (H<sub>2</sub>O/0,1 % CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ACN). Les éluats obtenus ont été récupérés et la colonne a été lavée à l'ACN pure (100 %).

L'ACN de l'éluât à 30 % d'ACN, contenant la MccJ25 (fraction active), a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 120 rpm avec une température de bain fixée à 40°C. La fraction récupérée ne contenant plus d'ACN a été lyophilisée, puis solubilisée dans de l'eau ultra-pure. Une analyse par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC, Beckman Coulter System Gold Préparative HPLC system) (Annex3) a été achevée sur une colonne C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 x 4,6 mm (Luna, Phenomenex) en utilisant comme éluant un mélange filtré d'eau ultra-pure/0,1 % CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'ACN/0,1 % CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un débit de 10 ml/min et une absorbance mesurée à 214 nm.

Un peptide pur a été utilisé comme témoin afin de repérer la MccJ25 en question. La fraction correspondant au pic de la MccJ25 identifié par comparaison avec le chromatogramme du peptide pur (pic à 47,69 % d'ACN, Amp : 1,8 AU, 18 minutes) a été récupérée. Une deuxième

étape de purification par RP-HPLC a été effectuée suivie par une lyophilisation et une solubilisation dans de l'eau ultra-pure et enfin un stockage de l'échantillon à -20°C.

### **3.3. Détermination de la concentration protéique**

La concentration protéique de la MccJ25 a été déterminée selon la méthode de lowry (Annex2) et ses collaborateurs, 1951 (Lowry, 1951). Le MccJ25 a été quantifié par HPLC en phase inverse en utilisant une colonne analytique C<sub>18</sub>. Afin de générer une courbe standard linéaire, des solutions mères de quantités connues de MccJ25 (100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05 et 0,025 g) ont été injectées dans la colonne HPLC à un débit de 1 ml/min et un gradient de 100 % solvant A (eau ultra-pure/0,1 % CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et 0 % solvant B (acétonitrile/0,1 % CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 50 % solvant A et 50 % solvant B et mesure de l'absorbance à 230 et 280 nm. L'aire du pic correspondant à MccJ25 a été calculé par intégration à l'aide du logiciel HPLC et la courbe étalon a été obtenue à partir de l'aire pour chaque concentration connue. La quantification de la MccJ25 produite et purifiée a été établie en se servant de l'équation de la courbe standard qui est une relation  $y = ax + b$ .

### **3.4. Évaluation de l'activité antibactérienne de la MccJ25**

L'activité antimicrobienne de l'échantillon a été évaluée à chaque étape de purification après avoir effectué une filtration à travers un filtre à seringue en acétate de cellulose ayant un seuil de rétention de 0,2 µm (VWR, Mississauga, ON, Canada). Deux méthodes ont été utilisées pour cet objectif : la méthode par diffusion en gélose (Wolf et Gibbons, 1996) et la méthode par microtitration (Daba *et al.*, 1994).

#### **3.4.1. Méthode de diffusion en gélose**

Une culture pure d'une nuit de *Salmonella enteritidis* a servie d'inoculer des boîtes de Pétri stériles contenant la gélose LB. L'inoculation de la souche cible est faites par étalement en surface (100µl). Après séchage des géloses inoculées, des puits de 7 mm de diamètre ont été creusés dans la gélose avec la partie non-effilée d'une pipette sérologique de 5 ml en verre. Ces puits ont été remplis de 80 µL de l'échantillon à tester (figure 12). Enfin, les boîtes de Pétri ont été incubées 18 h à 37°C. Les diamètres d'inhibition ont été mesurés le lendemain.

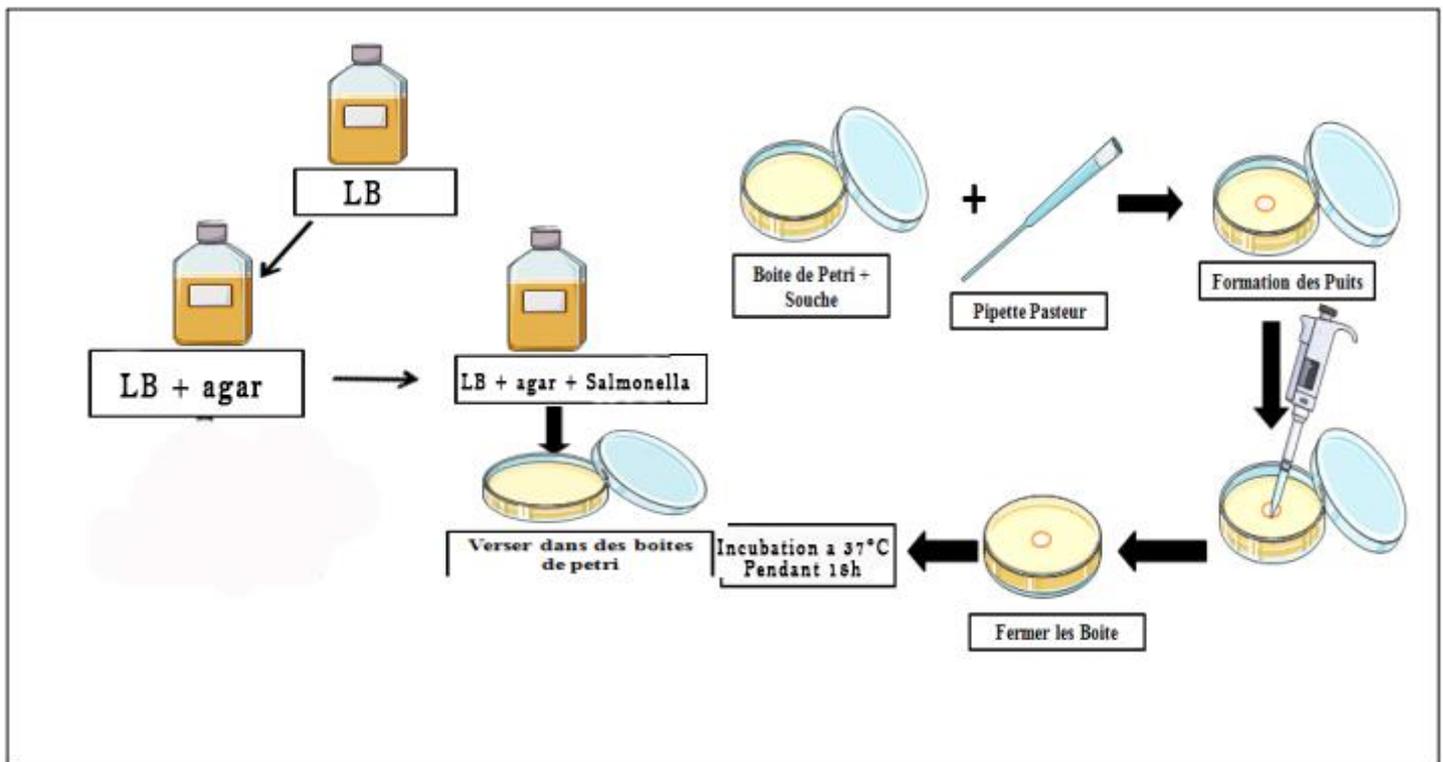


Figure 12 : schématisation de la méthode de diffusion sur gélose.

### 3.4.2. Méthode de microtitration

Une microplaque en polystyrène de 96 puits (Becton, Dickinson & Company, USA) a été utilisée afin d'évaluer l'activité inhibitrice face à *Salmonella enteritidis*. Pour ce faire, une dilution au demi en série d'une concentration connue de l'échantillon à tester a été réalisée dans les puits contenant préalablement le milieu de culture LB. Chaque puits a été inoculé d'une culture jeune de *Salmonella enteritidis* diluée à 1/1000 afin obtenir une concentration de 5.104 UFC/ml. La microplaque ainsi préparée a été incubée 18 h à 37°C en aérobie. Un spectrophotomètre (Molecular Devices ThermoMax Microplate Reader, OPTI-Resources, Québec, QC, Canada) a servi de mesurer la densité optique à 595nm. En connaissant la concentration initiale de l'échantillon testé (celle du premier puits avant dilutions), il a été possible de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) correspondant à la plus faible concentration de bactériocine pour laquelle une inhibition totale de la souche cible est observée (son absorbance est semblable à celle d'un milieu non-inoculé). L'activité en AU/ml a été calculée par la formule  $2^n (1000/125)$ . Dont :

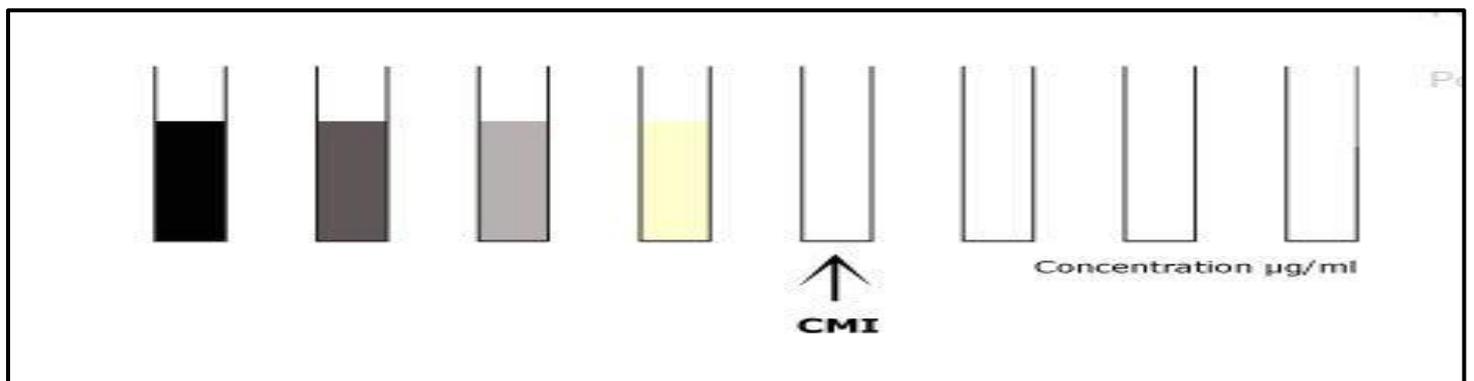
2 : le facteur de dilution.

n : le nombre de puits d'inhibition (où aucune croissance visible) ;

125: le volume en  $\mu\text{l}$  de substance testée.

- Rappelons que le principe général de détermination de la CMI en milieu liquide d'une molécule pure donnée est le suivant :

L'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution,) ou de cupules (méthode de microdilution,) (figure 14) contenant des concentrations décroissantes de la molécule à tester. Après incubation, à 37°C pendant 16 à 20 heures, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration de la substance à tester où aucune croissance n'est visible (figure 13) (Turcotte *et al.*, 2004).



**Figure 13** : détermination de la CMI par dilution successive en milieu liquide (macrodilution)

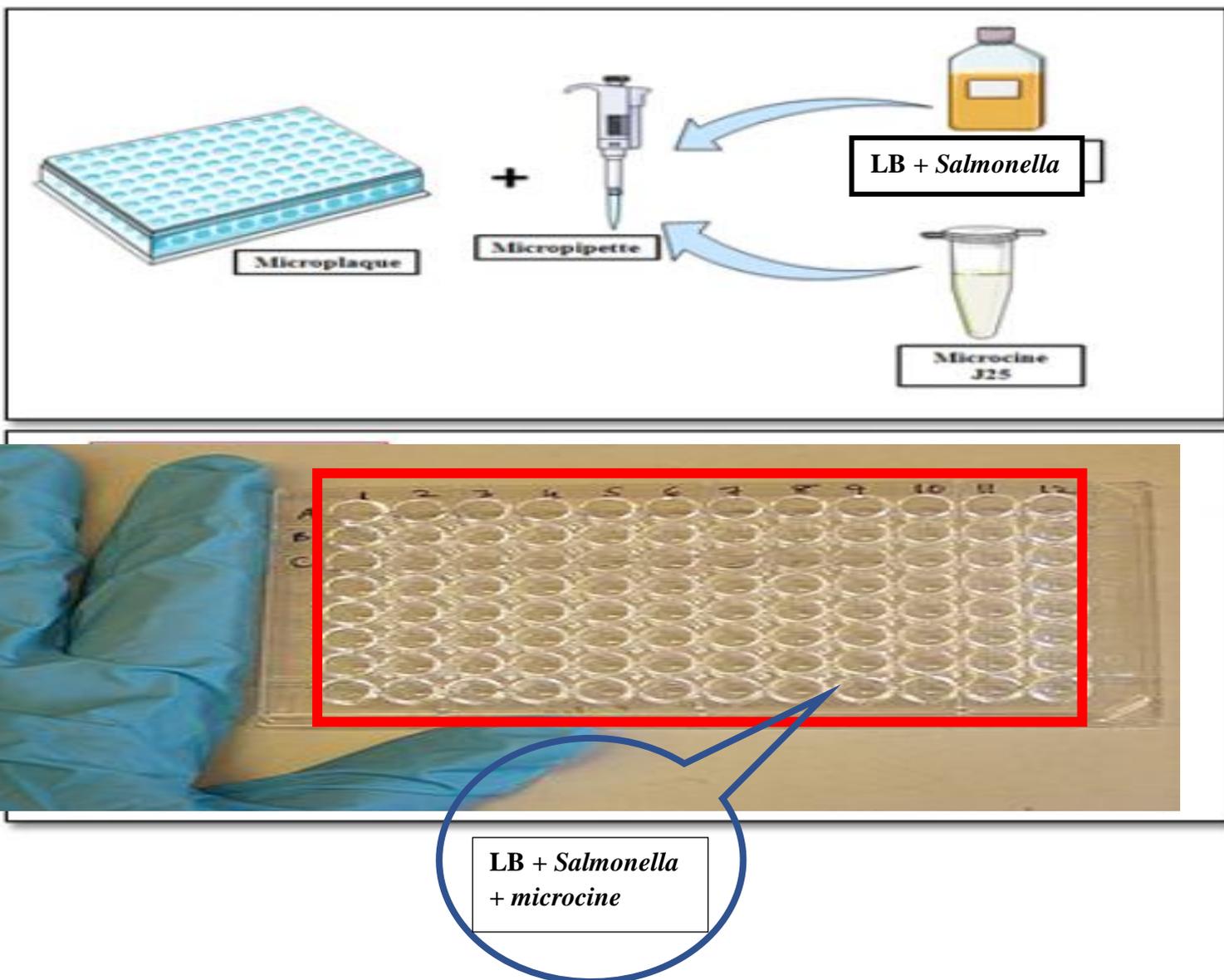


Figure 14 : détermination de la CMI par la méthode de microdilution.



**SYNTHÈSE DES  
RÉSULTATS ET  
DISCUSSION**

## 4. Synthèse des résultats et discussion

### 4.1. Production et purification de la MccJ25

#### 4.1.1. Production de la MccJ25

Le test de production de la microcine J25 sur milieu minimum M63 par les différentes souches d'*E.coli* a permis de récupérer à partir de 1,5l de culture environ 45 mg de MccJ25 pure correspondant à un rendement de 58% (Naimi *et al.*, 2020) et un volume de 13.6 ml de Mccj25 pure par Reinberg ses collaborateurs. (2015).

Les étapes réalisées de purification de la MccJ25 ont permis d'augmenter la concentration protéique de 0,1598 à 3,3203 mg/ml. La concentration totale de MccJ25 obtenue pour 1,5 L de milieu de culture a donc été de 45,16 mg (Reinberg *et al.*, 2015). Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

**Tableau 2** : résultats de production de la MccJ25 à partir d'une culture d'1,5 L d'*E.coli*.

Échantillon	Volume (mL)	[Protéine] (mg/mL)	Protéine totale (mg)
Surnageant après centrifugation	1500	0,16	239,69
Fraction après Sep-Pak et évaporateur	117,8	0,42	49,33
Fraction après RP-HPLC	13,6	3,32	45,16

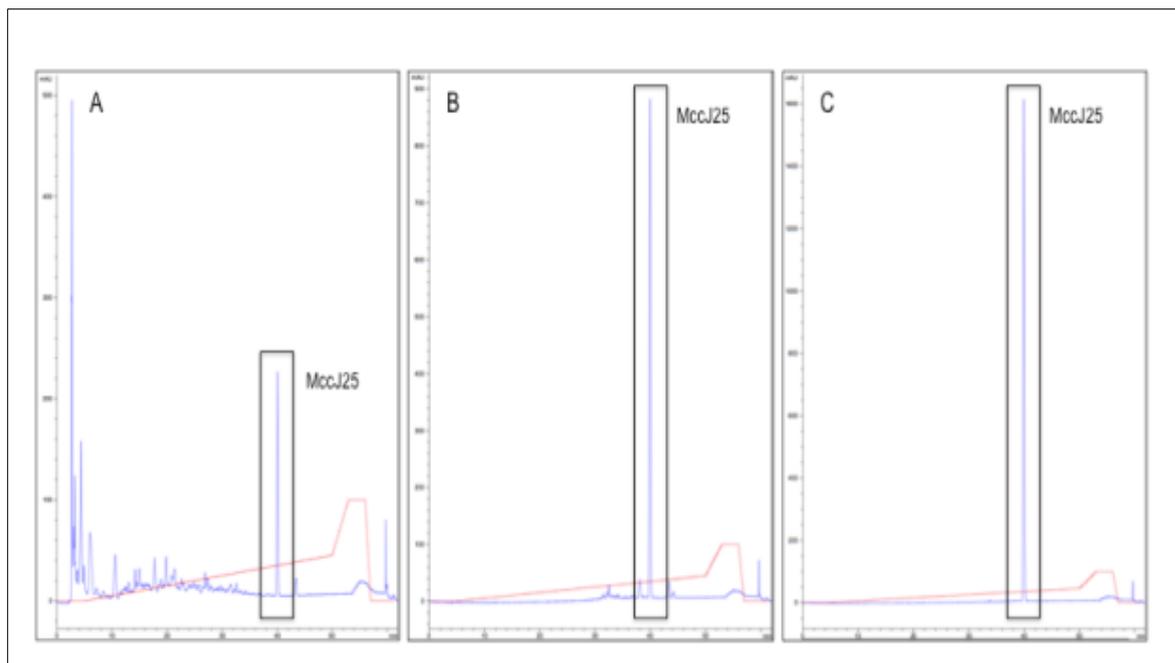
✚ Les concentrations sont celles obtenues par la méthode de Lowry.

Plusieurs travaux se sont orientés vers la production de la MccJ25 par des souches d'*E.coli* dans le but de tester l'efficacité de ce peptide contre différentes entérobactéries à savoir ; *Salmonella enterica*, *S. typhimurium* (Vincent *et al.*, 2004 ; Pomares *et al.*, 2010 ; Naimi *et al.*, 2018 ; Yu *et al.*, 2019 ; Naimi *et al.*, 2020 ; Ben said *et al.*, 2020), *E. coli*, *Shigella* (Pomares *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2020 ; Naimi *et al.*, 2020 ) et enfin, ETECK88 (Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88) (Yu *et al.*, 2018).

#### 4.1.2. Purification de la MccJ25

La purification de la MccJ25 se fait par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) analytique. L'évolution de la purification du peptide est bien visible, grâce à la variation de la teneur en ACN (de 10 % à 40 %) de la phase mobile. Les impuretés disparaissent progressivement au cours de la purification.

Le chromatogramme du surnageant de culture de la souche productrice montre au début de la purification, que la bactériocine recherchée se trouve dans un mélange de molécules (Figure 15.A). Cependant, le chromatogramme de la fraction à 30 % d'ACN en sortie de Sep-Pak montre que le degré de pureté de la MccJ25 commence à s'élever (Figure 15.B). Enfin, le chromatogramme de l'échantillon en sortie d'HPLC préparative dévoile que l'échantillon est pur et ne contient plus que la bactériocine d'intérêt (Figure 15.C).



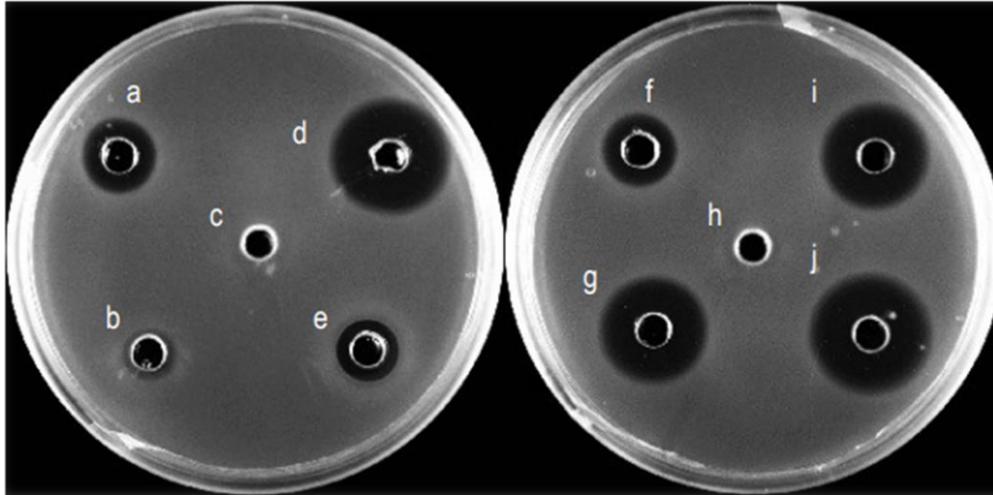
**Figure 15** : chromatogrammes par HPLC analytique des différentes étapes de purification de la bactériocine.

## 4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne de la MccJ25

### 4.2.1. Méthode de diffusion en gélose

L'évaluation de l'activité inhibitrice face aux bactéries test, à travers les différents éluats en sortie de colonne Sep-Pak C18, a permis d'identifier la fraction contenant la MccJ25. En effet, l'éluat à 30 % d'ACN constitue la fraction la plus active (figure 16, tableau 3) et donc

celle contenant la MccJ25 ce qui correspond avec les résultats obtenus par Destoumieux-Garzon et ses collaborateurs. (2005) (Destoumieux *et al.*, 2005).



**Figure 16** : résultats des tests d'activité contre *Salmonella enteritidis* par diffusion en gélose des différentes étapes de purification de la bactériocine. (A) : témoin positif ; (B) : fraction 20 % ACN après Sep-Pak et évaporateur ; (C) : témoin négatif ; (D) : surnageant après centrifugation ; (E) : témoin positif ; (F) : fraction 40 % ACN après Sep-Pak et évaporateur ; (G) : fraction (30 %) après 1ère lyophilisation ; (H) : témoin négatif ; (I) : fraction 30 % ACN après Sep-Pak et évaporateur ; (J) : fraction 30 % après RP-HPLC.

- D'autre part, les résultats obtenus par Naimi *et al.* (2020) ont dévoilé aussi l'effet inhibiteur remarquable de la microcine J25 sur *Salmonella enterica* et ce, par le développement de zones de lyse de diamètres importants en comparaison avec les témoins utilisés.
- De plus, l'étude effectuée par Yu *et al.* (2018) sur la bactérie ETECK88 (Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88) a montré une forte activité de la MccJ25 face à cette souche pathogène en formant de larges zones d'inhibitions sur la gélose

**Tableau 3 :** activité antimicrobienne contre *Salmonella enteritidis* en milieu LB des différentes fractions en sortie de colonne Sep-Pak C18.

Échantillon	Diffusion en gélose	Microtitration	
	Diamètre d'inhibition (cm)	Nb de puits d'inhibition	AU/mL
Surnageant avant Sep-Pak	1,85	11	16384
Surnageant après Sep-Pak	0	0	8
0 % ACN	0	0	8
10 % ACN	0	1	16
20 % ACN	0,9	2	32
30 % ACN	2,15	15	262144
40 % ACN	1,2	4	128
100 % ACN	0	1	16

#### 4.2.2. Méthode de microtitration

Les résultats des tests d'activité antibactérienne effectués par Reinberg *et al.* (2015) tout au long de processus de purification de la MccJ25 sont présentés dans les tableaux 3 et 4. L'activité inhibitrice a augmenté considérablement, de 16384 à 1048576 AU/ml, au cours de la purification puisque le produit final est d'un degré de pureté important. À la suite de la dernière lyophilisation, une concentration de 5,9122 mg/ml de MccJ25 a été obtenue (par la méthode de Lowry), elle est équivalente à 2805  $\mu$ M. Cette concentration du peptide a servi dans les tests d'activité par microtitration. La CMI de la MccJ25 a été évaluée en milieu LB à 0,02  $\mu$ M pour *Salmonella enteritidis*. De leur côté Naimi *et al.* (2020), ont pu déterminer une CMI égale à 0.03 $\mu$ M face à *S.enterica*. Ces résultats sont proches des valeurs de la CMI obtenue par Destoumieux-Garzon *et al.* (2005) estimées à 0,04  $\mu$ M de MccJ25 pour *S. enteritidis* cultivée en milieu pauvre (1 % de bactotryptone et 0,5 % de NaCl). De son côté, Pomares *et al.* (2010) a montré qu'une CMI plus importante et égale à 30 $\mu$ g/ml était efficace sur plusieurs entérobactéries en l'occurrence : *Salmonella*, *Shigella* et *E.coli*. Tandis que la CMI retrouvée par Yu *et al.* (2018) vis-à-vis de la souche ETECK88 (Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88) était égale à 0,25 $\mu$ g/ml. Cependant, les CMI de MccJ25 calculées pour différents sérotypes de *Salmonella pulorum* étaient variable entre 0,03 et 8  $\mu$ g/ml (Yu *et al.*, 2019). Les mêmes constatations ont été faites par Wang *et al.* (2020). En effet, les CMI de la microcine J25 testée face à *E. coli* AZ1 et *Salmonella* CVCC519 étaient 1.0  $\mu$ g/ml et 0.5  $\mu$ g/ml, respectivement

**Tableau 4 :** activité antimicrobienne contre *Salmonella enteritidis* de la MccJ25 au cours des différentes étapes de purification de la bactériocine.

Échantillon	Diffusion en gélose	Microtitration	Activité inhibitrice (AU/mL)
	Diamètre d'inhibition (cm)	Nb de puits d'inhibition	
Témoin négatif	0	0	0
Témoin positif	1,4	10	8192
Surnageant après centrifugation	1,6	11	16384
Fraction 20 % ACN après Sep-Pak et évaporateur	0	1	16
Fraction 30 % ACN après Sep-Pak et évaporateur	2,1	14	131072
Fraction 40 % ACN après Sep-Pak et évaporateur	1,4	6	512
Fraction (30 %) après 1 <sup>ère</sup> lyophilisation	1,9	16	524288
Fraction (30 %) après RP-HPLC	2	17	1048576

Une autre étude montre qu'il y a une activité antibactérienne contre la souche *E.coli* et *salmonella enteritidis* MNHN. Cette activité est observée jusqu'au quatrième puits pour *E.coli* alors que *salmonella enteritidis* MNHN est inhibée jusqu'au huitième puits. Les valeurs de CMI de MccJ25 obtenus sont : 64 (AU ml<sup>-1</sup>) et 128 (AU ml<sup>-1</sup>) respectivement. D'après ces résultats a été conclu que *Salmonella enteritidis* MNHN est plus sensible que *E. coli* à la Mccj25. Par ailleurs, une étude réalisée par Ben said et al. (2020) dans un but d'évaluer la microcine J25 comme inhibiteur de *Salmonella enteritidis* sérovars d'origines diverses, notamment humaines, animales et alimentaires. Parmi les 116 isolats testés, 37 (31,8 %) se sont révélés résistants à au moins un antibiotique, et 28 étaient multirésistants dont 19 exprimant le phénotype penta-résistant ACSSuT. La Microcin J25 a inhibé tous les isolats, avec des valeurs minimales de concentration inhibitrice allant de 0,06 g/ml (28,4 nM) à 400 g/ml (189 M). Et donc la Microcin J25 était un puissant inhibiteur de plusieurs isolats multi résistants de *Salmonella* et pourrait avoir un grand potentiel comme alternative aux antibiotiques. Les résultats de l'étude d'évaluation du potentiel d'utilisation de MccJ25 comme alternative aux

antibiotiques chez le bétail (Forkus *et al.*, 2017 ), montre qu' il était nécessaire de déterminer spécifiquement l'efficacité de MccJ25 contre un agent pathogène majeur, tel que *Salmonella Newport*, par une inhibition dans le milieu Lb avec une CMI 0.03 g /ml ,ce qui indique que la Mccj25 est puissante contre *Salmonella Newport* (Rintoul *et al.*, 2001 ), ce qui est donc proche des résultats de CMI vis-à-vis de *Salmonella enteritidis*. Les CMI sont dans une certaine mesure variable d'une étude à l'autre car la MccJ25 obtenue peut ne pas être totalement pure, tout comme il peut y avoir des erreurs de quantification du peptide avant les tests d'activité antimicrobienne (Duquesne *et al.*, 2007). Les protocoles expérimentaux diffèrent toujours d'une étude à l'autre, d'où la variabilité de résultat, ou tous dépendent la souche testée.

Enfin, les quantifications de la MccJ25 par la méthode de Lowry ne sont probablement pas optimales. En effet, dans la méthode de Lowry, des ions de cuivre se complexent avec les atomes d'azote des liaisons peptidiques de la protéine à quantifier. Le complexe formé présente une couleur bleue quantifiable au spectrophotomètre. La composition en acides aminés de la protéine à quantifier influe directement sur la coloration finale observable, or pour réaliser la courbe étalon, ils ont utilisé l'albumine de sérum bovin qui possède 583 acides aminés, alors que la MccJ25 ne possède que 21 acides aminés, ce qui a probablement dû amener de l'erreur. Il aurait fallu utiliser pour le standard une protéine d'une structure plus semblable à la bactériocine (Reinberg *et al.*, 2015).

# CONCLUSION

## 5. Conclusion

L'utilisation d'antibiotiques pour traiter les maladies causées par des bactéries résistantes ne donne plus de résultats satisfaisants, ce qui rend la recherche d'alternatives de plus en plus urgente. Parmi les approches alternatives proposées, l'utilisation d'antimicrobiens naturels tels que la microcine j25 a suscité un grand intérêt.

L'objectif de ce travail théorique consiste en la production et la purification de la MccJ25 en vue de son utilisation *in vitro* et d'évaluer son activité biologique antibactérienne contre quelques Entérobactéries multirésistantes appartenant aux genres *Salmonella*, *Shigella* et *E. coli*.

Cette bactériocine étudiée produite par l'espèce à Gram négatif *E. coli* sur milieu minimum M63 a permis de récupérer à partir de 1,5l de culture environ 45 mg de MccJ25 pure correspondant à un rendement de 58% (Naimi *et al.*, 2020) et un volume de 13.6 ml de Mccj25 pure par Reinberg ses collaborateurs. (2015), cette étape de production demeure une étape cruciale pour la réalisation d'études, après avoir purifier une quantité de MccJ25 égale à 45,16 mg, l'activité antibactérienne contre la souche testée augmente considérablement lors des étapes de purification de cette bactériocine de 16384 à 1048576 AU/ml.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de MccJ25 contre *S. enteritidis* a été déterminée à 0,02 M dans le milieu LB, Des études antérieures ont également montré que les résultats de La concentration minimale inhibitrice (CMI) de MccJ25 contre d'autres types de *salmonella* sont limitent dans un intervalle de 0.03  $\mu$ M à 8  $\mu$ M. D'autre part, Pomares et son équipe. (2010) a montré qu'une CMI plus importante et égale à 30 $\mu$ g/ml était efficace sur plusieurs entérobactéries en l'occurrence : *Salmonella*, *Shigella* et *E. coli*. Tandis que les résultats de la CMI retrouvée pour la souche *E. coli* pathogène allant du 0.25  $\mu$ M à 1.0  $\mu$ M, d'après ces résultats, et d'autres répondant au même objectif, la microcine j25 pourrait être une bonne proposition comme alternative aux antibiotiques car c'est un puissant inhibiteur de différents entérobactéries.

Au terme de cette étude théorique approfondie, nous pouvons proposer quelques **perspectives** complétant l'objectif souhaitée tel que, des études, *in vivo* sur l'action de la **microcine J25**,

synthétisées, principalement, par *Escherichia coli* sont nécessaires, en particulier la vérification de leur effet sur les cellules animales en vue d'une éventuelle application thérapeutique, et l'optimisation de la production de la Mcc J25 dans un but d'obtenir une quantité maximale du peptide en question.

# ABSTRACT

## 6. Abstract

Intestinal poisons cause serious health problems in humans and young animals due to contamination of food and feed. With the emergence of public health problems and the high-speed diffusion of drug opposition from bacteria, the adoption of antimicrobial peptides as potential candidates in the treatment of pathogenic infections has increased. Microcin J25 (MccJ25), a class of lasso peptides separated from an *E.coli*-producing strain, has been shown to exhibit potent antimicrobial behavior. In the present theoretical study, the evaluation of the importance and the antibacterial power of the peptide MccJ25 has been described with respect to certain multiresistant enterobacteria with a view to its use as an alternative to antibiotics both in animals and in animals. human.

The test for the production of microcine J25 on minimum medium M63 by different strains of *E.coli* made it possible to recover from 1.5 l of culture, approximately 45 mg of pure MccJ25 corresponding to a yield of 58% (Naimi et al. ., 2020) and a volume of 13.6 ml of pure Mccj25 by Reinberg et al. (2015).

However, purification of MccJ25 increased the protein concentration from 0.1598 to 3.3203 mg / ml. The total concentration of MccJ25 obtained for 1.5 L of culture medium is 45.16 mg (Reinberg et al., 2015).

Furthermore, the tests of inhibitory activity against the test bacteria, through the various eluates at the outlet of the Sep-Pak C18 column, made it possible to identify the fraction containing MccJ25.

In fact, the 30% ACN eluate constitutes the most active fraction and this, by developing areas of lyses of large diameter.

In addition, the inhibitory activity tested during purification and performed by the microtiter method showed a considerable increase, from 16384 to 1048576 AU / ml. The MIC of MccJ25 was evaluated in LB medium at 0.02  $\mu$ M for *Salmonella enteritidis* and at 0.03  $\mu$ M against *S.enterica*.

**Keywords:** Mcc J25, *E.coli*, Salmonella, Schigella, antimicrobial activity, MIC, antibiotic resistance.

ملخص

## 7. ملخص

تسبب السموم المعوية مشاكل صحية خطيرة للإنسان وصغار الحيوانات بسبب تلوث الأغذية والأعلاف. مع ظهور مشاكل الصحة العامة والانتشار السريع لمقاومة الأدوية من البكتيريا، ازداد اعتماد البيبتيدات المضادة للميكروبات كمرشحين محتملين في علاج العدوى المسببة للأمراض. تم إثبات أن Microcin J25 (MccJ25)، فئة من بيبتيدات اللاسو المنفصلة عن سلالة منتجة للإشريكية القولونية، تظهر سلوكاً قوياً مضاداً للميكروبات. في الدراسة النظرية الحالية، تم وصف تقييم أهمية وقوة البيبتيد المضادة للبكتيريا MccJ25 فيما يتعلق ببعض البكتيريا المعوية متعددة المقاومة بهدف استخدامها كبديل للمضادات الحيوية في كل من الحيوانات والحيوانات.

أتاح اختبار إنتاج ميكروسين J25 على الوسط M63 الأدنى بواسطة سلالات مختلفة من الإشريكية القولونية إمكانية التعافي من 1.5 لتر من المزرعة، حوالي 45 مجم من MccJ25 النقي الذي يقابل عائد 58% (النعمي وآخرون، 2020) وحجم 13.6 مل من Mccj25 النقي بواسطة Reinberg et al (2015).

ومع ذلك، أدى تنقية MccJ25 إلى زيادة تركيز البروتين من 0.1598 إلى 3.3203 مجم / مل. التركيز الكلي لـ MccJ25 الذي تم الحصول عليه مقابل 1.5 لتر من وسط الاستزراع هو 45.16 مجم (Reinberg et al., 2015).

علاوة على ذلك، فإن اختبارات النشاط التثبيطي ضد بكتيريا الاختبار، من خلال العناصر المتنوعة عند مخرج عمود Sep-Pak C18، جعلت من الممكن تحديد الجزء الذي يحتوي على MccJ25.

في الواقع، يشكل شطف 30% ACN الجزء الأكثر نشاطاً وهذا، من خلال تطوير مناطق من lyses ذات القطر الكبير.

بالإضافة إلى ذلك، أظهر النشاط المثبط الذي تم اختباره أثناء التنقية وتم إجراؤه بواسطة طريقة microtiter زيادة كبيرة، من 16384 إلى 1048576 AU / ml. تم تقييم CIM لـ MccJ25 في وسط LB عند 0.02 ميكرومتر من أجل *Salmonella enteritidis* وعند 0.03 ميكرومتر مقابل *S. enterica*.

الكلمات المفتاحية: Mcc J25، *E. coli*، *Salmonella*، *Schigella*، نشاط مضادات الميكروبات، CMI، مقاومة المضادات الحيوية.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

## 8. Références bibliographiques

### A

Andres, E., Dimarcq J. (2007). Cationic antimicrobial peptides : from innate immunity study to drug development. Update. *Médecine Mal Infect.* Apr ;37(4) :194–9.

### B

Ben Said, L., Emond-Rheault, J. G., Soltani, S., Telhig, S., Zirah, S., Rebuffat, S., et al. (2020). Phenomic and genomic approaches to studying the inhibition of multiresistant *Salmonella enterica* by microcin J25. *Environ. Microbiol.* 22, 2907–2920. doi: 10.1111/1462-2920.15045

Bellomio, A., Vincent, P. A., de Arcuri, B. F., Salomon, R. A., Morero, R. D. and R. N. Farias. (2004). 'The microcin J25 bêta-hairpin region is important for antibiotic uptake but not for RNA polymerase and respiration inhibition', *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 1454-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.186

Blanchète, JP. (2009). Règles de la consultation gynécologique. *Journal de gynécologie obstétrique de la reproduction*; 38 :263-268.

Blond, A., Peduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M. J., Barthelemy, M., Prigent, Y., Salomon, R. A., Farias, R. N., Moreno, F., and Rebuffat. S. (1999). 'The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*', *Eur J Biochem*, 259, 747-55.

Blond, A., Peduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M. J., Barthelemy, M., Prigent, Y., Salomon, R. A., Farias, R. N., Moreno, F., Rebuffat, S. (1999). The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 259(3), 747-756.

Blond, A. M., Cheminant, Destoumieux-Garzon.D., Segalas-Milazzo. I., Peduzzi. J., Goulard C., and Rebuffat. S. (2002). 'Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity', *Eur J Biochem*, 269, 6212-22.

Boyce, JM., Potter-bynoe G, Chenevert C, King T. (1997) Environnemental contamination due to methicillin-résistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control HospEpidemiol*; 18: 622-9.

Brändén, C-I., Tooze. J. (1996), "Introduction à la structure des protéines" De Boeck Université: 75-150.

Bricha, S., et al. (2009). Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Tunisienne d'Infectiologie.*; 2: 7 – 14.

Bush. K. (1996). Is it important to identify extended-spectrum bêta-lactamase-producing isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Mai*, pp. 15(5) :361 -4.

## C

Cattoen, C., 13 février (2015). Persistence du portage de bactéries multirésistantes après la réanimation. 2 p. Disponible sur : [link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13546-015-1048-4.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13546-015-1048-4.pdf)

Choudhury, H. G., Z. Tong, I. Mathavan, Y. Li, S. Iwata, S. Zirah, S. Rebuffat, H. W. van Veen, and K. Beis. (2014). 'Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 9145-50. doi: 10.1073/pnas.1320506111

## D

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R. E., Lemieux, L. (1994). Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(6), 682-688.

Destoumieux-Garzon, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S., Boulanger, P. (2005). The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16  $\beta$ -hairpin region in the recognition mechanism. *Biochemical Journal*, 389(3), 869-876.

Destoumieux-Garzon, D, Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2002). 'Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action', *Biochimie*, 84, 511-9.

DIAMOND G, BECKLOFF N, WEINBERG A, O'ISICH K. (2009). The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr Pharm Des.* 15(21) :2377–92.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. (2000). Exotoxins of staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev. 13(1): 16-34.

Duarte, M., et al. (2001). "Rapid identification of Escherichia coli microcin J25 producing strains using polymerase chain reaction and colony blot hybridization." Canadian journal of microbiology 47(9): 877-882.

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. Nat. Prod. Rep. 24, 708–734. doi: 10.1039/b516237h

## *E*

Edouard PF, et al. (2006). The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities. Clin Infect Dis. 42 (5) : 692-699.

## *F*

Forkus, B., Ritter, S., Vlysidis, M., Geldart, K., and Kaznessis, Y. N. (2017). Antimicrobial probiotics reduce Salmonella enterica in turkey gastrointestinal tracts. Sci. Rep. 7, 1–9. doi: 10.1038/srep40695

Fraude K, Rapp C, Guerry JJ. (2007). Pneumonie à Pseudomonas aeruginosa. Pathologies infectieuses. 548-560.

## *G*

Galván, A., et al. (2018). "Cytochromes bd-I and bo3 are essential for the bactericidal effect of microcin J25 on *Escherichia coli* cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*1859(2): 110-118.

Gildas CZA, Danièle M, Sakina El Hamzaoui. (2013). Résistance à l'imipénème par production de métallo-lactamases par *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* à l'Hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat. *Ann Biol Clin.* 71 (1): 27-30.

Gottler, L. M. and Ramamoorthy. A., (2009). "Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin." *Biochim Biophys Acta* 1788(8): 1680-6.

## *H*

Hortense GK, et al. (2015). Caractérisation phénotypique des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la ville de Yaoundé (Cameroun). *African Journal of Pathology and Microbiology.* 4: 4 p.

## *J*

JARLIER V., ARNAUDI., CARBONNE A. (2010). Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin. Résultats. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/>.

JENSSEN H, HAMILL P, HANCOCK REW. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* Jul ;19(3):491–511.

Julie. B. (2014). Utilisations raisonnées des antibiotiques en élevage porcin, démarche d'accompagnement dans sept élevages, science vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, 2014, p11

## *L*

LAI Y, GALLO RL. (2009). Antimicrobial peptides : Discovery, design, and novel therapeutic strategies. Trends Immunol. 30(3) :131–41.

Lambert T. (1997). Etat actuel de la sensibilité des bactéries aux aminosides. Les associations antibiotiques en réanimation. Réan Urg ; 6 : 9-16.

Leclercq, R. (2002). Résistance des Staphylocoques aux antibiotiques. Ann Fr Anesth Reanim. pp. 21 : 375-383.

Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. Am J Transl Res.11(7):3919–31. Epub 2019/08/10. PubMed PMID : 31396309 ; PubMed Central PMCID : PMC6684887.

Lopez-Bucio, J., et al. (2000). "Organic acid metabolism in plants : from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils." Plant Science160(1) : 1-13.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

LOZNIEWSKI A., RABAUD C juillet. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Nancy : CCLIN Sud-Est –

## *M*

Mathavan, I., Zirah, S., Mehmood, S., Choudhury, H. G., Goulard, C., Li, Y., Robinson, C. V., Rebuffat, S., and Beis. K. (2014). 'Structural basis for hijacking siderophore receptors by antimicrobial lasso peptides', *Nat Chem Biol*, 10, 340-2. doi: 10.1038/nchembio.1499

Mehdi. S. (2008). La fréquence des bactéries multi résistante à l'hôpital Hassan ii de Settat. THESE. [En ligne]. Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie. RABAT: UNIVERSITE MOHAMMED VFACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE, 48-51p.

Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Long Island, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mishra B, Reiling S, Zarena D, Wang G. (2017). Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Curr Opin Chem Biol*. 38:87–96. Epub 2017/04/12. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.03.014. PubMed PMID: 28399505; PubMed Central PMCID: PMC5494204.

Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R. M., and Ebricht. R. H. (2004). 'Antibacterial Peptide Microcin J25 Inhibits Transcription by Binding within and Obstructing the RNA Polymerase Secondary Channel', *Molecular Cell*, 14, 739-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.010>

## *N*

Naimi, S., Zirah, S., Hammami, R., Fernandez, B., Rebuffat, S., and Fliss, I. (2018). Fate and biological activity of the antimicrobial lasso peptide microcin J25 under gastrointestinal tract conditions. *Front. Microbiol.* 9:1764. doi: 10.3389/fmicb.2018.01764

Naimi, S., Zirah, S., Hammami, R., Fernandez, B., Rebuffat, S., and Fliss, I. (2020). Fate and biological activity of the antimicrobial lasso peptide microcin J25 under gastrointestinal tract conditions. *Front. Microbiol.* 9 :1764. doi.org/10.3389/fmicb.2020.00988

## *P*

Patwardhan RB, Dhakephalkar PK, Niphadkar KB, et al. (2008). A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multirésistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *Indian J Med Res.* ;128(2) :178-87.

Pauling, L., Corey, R. B., et al. (1951). "The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 37(4): 205-11.

Poirel, P., Nordmann. L. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* pp. 12 :826-36.

Pomares, M. F., R. A. Salomon, O. Pavlova, K. Severinov, R. Farias, and P. A. Vincent (2009). 'Potential applicability of chymotrypsin-susceptible microcin J25 derivatives to food preservation', *Appl Environ Microbiol*, 75, 5734-8. doi: 10.1128/AEM.01070-09

Pomares MF, Delgado MA, Corbalan NS, Farias RN, Vincent PA. (2010). Sensitization of microcin J25-resistant strains by a membrane-permeabilizing peptide. *Appl Environ Microbiol.* 76 (20): 6837-6842. 10.1128/AEM.00307-10.

Pomares, M. F., N. S. Corbalan, C. Adler, R. de Cristobal, R. N. Farias, M. A. Delgado, and P. A. Vincent. (2013). 'Macrophage environment turns otherwise MccJ25-resistant Salmonella into sensitive', *BMC Microbiol*, 13, 95. doi: 10.1186/1471-2180-13-95

Pool K. (2005). Efflux mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrobial Chemother.* 56(1): 20-51.

POWERS JP, HANCOCK RE. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides.* ;24(11) :1681–91.

## *R*

Reinberg, E. (2015). Étude in vitro de la stabilité gastro-intestinale et de l'activité biologique de la microcine J25 : impact sur l'équilibre du microbiote colique et activité inhibitrice contre *Salmonella enteritidis*, Université Laval.

Rintoul, M. A. R., de Arcuri, B. F., Salomón, R. A., Farias, R. N., and Morero, R. D. (2001). The antibacterial action of microcin J25 : evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella newport*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 204, 265–270. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10895.x

Rogers, L.A. (1928). THE INHIBITING EFFECT OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* ON *LACTOBACILLUS BULGARICUS*. *J. Bacteriol.* 16, 321–325.

Rosengren, K. J., Blond, A., Afonso, C., Tabet, J. C., Rebuffat, S., and Craik, D. J. (2004). 'Structure of thermolysin cleaved microcin J25: extreme stability of a two-chain antimicrobial peptide devoid of covalent links', *Biochemistry*, 43, 4696-702. doi: 10.1021/bi0361261

## S

Salomon, R. A., and Farias, R. N. (1993), 'The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake', *J Bacteriol*, 175, 7741-2.

Salomon, R. A., and Farias, R. N. (1995), 'The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein', *J Bacteriol*, 177, 3323-5.

Sanders, CC. (1991). New bêta-lactams: new problems for the internist. *Ann Intern Med.* pp. 115(8) :650-1.

Semenova, E., Yuzenkova, Y., Peduzzi, J., Rebuffat, S., and Severinov. K. (2005). 'Structure-activity analysis of microcinJ25 : distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase', *J Bacteriol*, 187, 3859-63. doi: 10.1128/JB.187.11.3859-3863.2005

Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Fariás, R. N., González-Pastor, J. E., Moreno, F., and Salomón. R. A. (1999). 'Sequence Analysis of the Four Plasmid Genes Required to Produce the Circular Peptide Antibiotic Microcin J25', *Journal of Bacteriology*, 181, 2659-62.

Soussy CJ. (2007). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Les infections urinaires. Part of the séries. *Monographiques en urologie.* : 21-46.

Stéphanie. (2009). Transfert d'un gène de résistance aux beta-lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la ore intestinale humaine : inuence d'un traitement antibiotique. Medication.Universite Rennes 1. French

## *T*

Taale, E., et al. (2016). "Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines." *International Journal of Biological and Chemical Sciences*10(1) : 384-399.

Turcotte, Lacroix, et al. (2004). "A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins." *International journal of food microbiology*90(3) : 283-293.

## *V*

Vincent C. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* 52. 607–616.

Vincent. J. (2000). Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : bilan en 2000et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN)

Vincent, P. A., Delgado, M. A., Farias, R. N., and Salomon, R. A. (2004). Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. *FEMS Microbiol. Lett.* 236 :103–107.

## W

Wang G, Song Q, Huang S, Wang Y, Cai S, Yu H, Ding X, Zeng X, Zhang J. (2020) Effect of antimicrobial peptide microcin J25 on growth performance, immune regulation, and intestinal microbiota in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Animals* 10 :345. [https:// doi.org/10.3390/ani10020345](https://doi.org/10.3390/ani10020345)

Wilson, K. A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B. T., Landick, R., Muir, T., Severinov, K., and Darst. S. A. (2003). 'Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail', *J Am Chem Soc*, 125, 12475-83. doi: 10.1021/ja036756q

Wolf, C. E., Gibbons, W. R. (1996). Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(4), 453-457.

## Y

Yan, K. P., Li, Y., Zirah, S., Goulard, C., Knappe, T. A., Marahiel, M. A., and Rebuffat, S. (2012). 'Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 in vitro', *ChemBiochem*, 13, 1046-52. doi: 10.1002/cbic.201200016

Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27–55.

Yedery RD, Jerse AE. (2015). Augmentation of Cationic Antimicrobial Peptide Production with Histone Deacetylase Inhibitors as a Novel Epigenetic Therapy for Bacterial Infections. *Antibiotics (Basel)*. 4(1) :44-61. Epub 2015/01/01. doi: 10.3390/antibiotics4010044. PubMed PMID: 27025614; PubMed Central PMCID: PMC4790325.

Yu, H.; Shang, L.; Zeng, X.; Li, N.; Liu, H.; Cai, S.; Huang, S.; Wang, G.; Wang, Y.M.; Song, Q.L.; et al. (2018). Risks Related to High-Dosage Recombinant Antimicrobial Peptide Microcin J25 in Mice Model: Intestinal Microbiota, Intestinal Barrier Function, and Immune Regulation. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 11301–11310. [CrossRef]

Yu HT, Shang LJ, Zeng XF, et al. (2019). Risks related to high-dosage recombinant antimicrobial peptide Microcin J25 in mice model: Intestinal microbiota, intestinal barrier Function, and immune regulation. *J Agric Food Chem.* 66 :11301-11310.

## Z

Zahar JR, Manzer MF, Koratch, A. (2012). L'isolement en réanimation : intérêt, limites, perspectives. *Réa.*: 494-502.

Zasloff, M. (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15) : 5449-53.

## Sites Web :

**Anonyme 1** : Legrand, O. (2017). Implication du pharmacien hospitalier dans la prise en charge des infections à bactéries multiresistantes : revue de pertinence des prescriptions de piperacilline/tazobactam et épargne des antibiotiques à large spectre au centre hospitalier d'Aubagne Université d'Aix-Marseille.

**Anonyme 2** : Résistance aux antibiotiques [En ligne]. [Consulté le 24 juin 2021] ; Disponible à partir de l'URL : <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-etmicrobiologie/dossiers-d-information/resistance-aux-antibiotiques>.

**Anonyme 3 :** InVS (Institut de Veille Sanitaire). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006. Disponible sur : [http://www.invs.sante.fr/publications/2009/enquete\\_prevalence\\_infections\\_nosocomiales/enquete\\_prevalence\\_infections\\_nosocomiales\\_vol1.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2009/enquete_prevalence_infections_nosocomiales/enquete_prevalence_infections_nosocomiales_vol1.pdf).

**Anonyme 4 :** Prévention des infections à bactéries multirésistantes en réanimation (en-dehors des modalités d'optimisation de l'antibiothérapie) (CC 1996). XVIème conférence de consensus de la SRLF : Résumé.

# ANNEXES

## 9. Annexes

### Annexe 1 : taxonomie bactérienne des BMR

#### *Salmonella typhimurium*

Règne : Bacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Salmonella*

Espèce : *typhimurium*

#### *Salmonella enterica*

Règne : Bacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Salmonella*

Espèce : *enterica*

#### *Shigella dysenteria*

Règne : Bacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Shigella*

Espèce : *dysenteria*

### ***Escherichia coli***

Règne : Bacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Escherichia*

Espèce : *coli*

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Règne : Bacteria

Embranchement : Prokaryota

Division : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *aeruginosa*

***Staphylococcus aureus***

Règne : Bacteria

Division : firmicites

Classe : bacili

Ordre : bacillales

Famille : staphylococcaceae

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *aureus*

***Acinitobacter bumanii***

Régne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Moraxellaceae

Genre : *Acinitobacter*

Espèce : *bumanii*

**Annexe 2 : Méthode de Lowry**

La méthode de Lowry est une autre méthode de dosage colorimétrique des protéines, ce dosage selon un protocole : mélanger la solution alcaline (solution de carbonate de sodium alcalin à 20g/L dans 0.1M de soude) à la solution de protéines à doser, puis d'ajouter une solution de sulfate de cuivre et de tartrate double de sodium et de potassium. Laisser incuber au minimum 10 minutes à température ambiante. Ajouter ensuite le réactif de Folin (dilué au demi) sous agitation rapide. Attendre 30 minutes, et mesurer la DO à 750 nm.

### **Annexe 3 : Chromatographie en phase liquide à haute performance**

Est une technique de séparation analytique et/ou préparatrice de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles (voir Colonne) sur un montage haute pression. La plupart des colonnes actuelles utilisées en HPLC sont peu polaires et hydrophobes. Elles sont dites à phase inverse. Parmi elles, les colonnes de type C18 sont les plus courantes. Le terme C18 correspond à un greffage d'une chaîne carbonnée de 18 carbones  $(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$  sur le gel de silice. Les phases stationnaires C8, un peu moins apolaires sont également très largement utilisées. Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

<p><b>Nom et Prénom : MENNOUR MANEL</b>  <b>Nom et Prénom : LEMENADJLIA HAMZA</b></p>	<p><b>Date de soutenance : 29/09/2021</b></p>
<p align="center"><b>Thème : Production et évaluation de l'activité biologique de la Microcine J25 sur quelques Entérobactéries multirésistantes.</b></p>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Les poisons intestinaux induisent de graves problèmes de santé chez les humains et les jeunes animaux en raison de la contamination des aliments et des aliments pour animaux. Avec l'émergence de problèmes de santé publique et la diffusion à grande vitesse de l'opposition médicamenteuse des bactéries, l'adoption de peptides antimicrobiens comme candidats potentiels dans le traitement des infections pathogènes a augmenté. La Microcin J25 (MccJ25), une classe de peptides lasso séparés d'une souche productrice d'<i>E.coli</i>, s'est avéré présenter un puissant comportement antimicrobien. Dans la présente étude théorique, l'évaluation de l'importance et le pouvoir antibactérien du peptide MccJ25 a été décrite vis – à- vis de certaines entérobactéries multirésistantes en vue, de son utilisation comme alternative aux antibiotiques aussi bien chez l'animal que chez l'humain.</p> <p>Le test de production de la microcine J25 sur milieu minimum M63 par différentes souches d'<i>E.coli</i> a permis de récupérer à partir de 1,5l de culture, environ 45 mg de MccJ25 pure correspondant à un rendement de 58% (Naimi et al., 2020) et un volume de 13.6 ml de Mccj25 pure par Reinberg ses collaborateurs. (2015).</p> <p>Cependant, la purification de la MccJ25 a permis d'augmenter la concentration protéique de 0,1598 à 3,3203 mg/ml. La concentration totale de MccJ25 obtenue pour 1,5 L de milieu de culture est de 45,16 mg (Reinberg et al., 2015).</p> <p>Par ailleurs, les tests d'activité inhibitrice face aux bactéries test, à travers les différents éluats en sortie de colonne Sep-Pak C18, ont permis d'identifier la fraction contenant la MccJ25.</p> <p>En effet, l'éluat à 30 % d'ACN constitue la fraction la plus active et ce, en développant des zones de lyses de diamètre important.</p> <p>En complément, l'activité inhibitrice testée au cours de la purification et effectuée par la méthode de microtitration a montré une augmentation considérable, de 16384 à 1048576 AU/ml. La CMI de la MccJ25 a été évaluée en milieu LB à 0,02 µM pour <i>Salmonella enteritidis</i> et à 0.03µM face à <i>S.enterica</i>.</p>	
<p><b>Mots clés : Mcc J25, E.coli, Salmonella, Schigella, activité antimicrobienne, CMI, résistance aux antibiotiques.</b></p>	
<p><b>Président de jury : Dr. BENHAMDI A.</b>  <b>Rapporteur : Dr. YUCEF ALI M.</b>  <b>Examineur : Dr. ZITOUNI H.</b></p>	<p><b>MCB. UFM. Constantine 1.</b>  <b>MCB. UFM. Constantine 1.</b>  <b>MCB. UFM. Constantine 1.</b></p>