



Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur

Thèse présentée à l'université de Lille, Faculté des sciences et technologies

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université

Spécialité : Electronique, microélectronique, nanoélectronique et micro-ondes

Présentée par NOURA HAZIME

Potentialisation *in vitro* de l'activité anti-*Escherichia coli* de la colistine par combinaison avec des bactériocines et des nanoparticules

Soutenue le 18 octobre 2019 devant le jury

Membres du jury

Pr. Pascal DHULSTER	ICV, Univ. Lille	Président
Pr. Nadia EVERAERT	Univ. Liège	Rapporteur
Pr. Chantal PICHON	Univ. Orléans	Rapporteur
Dr. Mohammad AMICHE	IMRB-U955 INSERM	Examineur
Dr. Rabah BOUKHERROUB	CNRS, Univ. Lille	Directeur de thèse
Pr. Djamel DRIDER	ICV, Univ. Lille	Co-directeur de thèse
Dr. Yanath BELGUESMIA	ICV, Univ. Lille	Invité



Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur

Thèse présentée à l'université de Lille, Faculté des sciences et technologies

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université

Spécialité: Electronique, microélectronique, nanoélectronique et micro-ondes

Présentée par NOURA HAZIME

Potentialisation *in vitro* de l'activité anti-*Escherichia coli* de la colistine par combinaison avec des bactériocines et des nanoparticules

Soutenue le 18 octobre 2019 devant le jury

Membres du jury

Pr. Pascal DHULSTER	ICV, Univ. Lille	Président
Pr. Nadia EVERAERT	Univ. Liège	Rapporteur
Pr. Chantal PICHON	Univ. Orléans	Rapporteur
Dr. Mohammad AMICHE	IMRB-U955 INSERM	Examineur
Dr. Rabah BOUKHERROUB	CNRS, Univ. Lille	Directeur de thèse
Pr. Djamel DRIDER	ICV, Univ. Lille	Co-directeur de thèse
Dr. Yanath BELGUESMIA	ICV, Univ. Lille	Invité

RESUME

Les colibacilloses ou infections à Escherichia coli sont des infections bactériennes fréquentes et importantes en pathologie vétérinaire. E. coli est l'un des principaux agents bactériens pathogènes chez le porc. Ce type de pathologie est traité sur la base d'une antibiothérapie. Cependant, l'efficacité de ce traitement dans le contrôle et la limitation de la dissémination de ce pathogène est contestée par l'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques. L'augmentation globale de l'antibiorésistance, accompagnée de la pénurie de nouvelles molécules disponibles en médecine humaine pour traiter les infections dues aux bactéries à Gram négatif multi-résistantes, a conduit à la réhabilitation de la colistine comme antibiotique de dernier recours. Toutefois, l'usage de cet antibiotique n'a jamais quitté le circuit vétérinaire, et particulièrement les élevages de porcs, permettant ainsi de contrôler les diarrhées colibacillaires qui génèrent des pertes économiques importantes pour les éleveurs. Le principal objectif de cette thèse est de réduire significativement la quantité de colistine utilisée dans les élevages de porcs en développant des concepts innovants basés sur la potentialisation de la colistine par des peptides antimicrobiens, puis l'administration de la colistine seule ou en combinaison avec des bactériocines dans des nanoparticules (50-100 nm). Ces formulations pourront être libérées directement sur le site de l'infection, et ont l'avantage de résister à l'environnement gastro-intestinal

Mots clés : *Nanoparticules, colistine, Escherichia coli, résistance antibactérienne, peptides antimicrobiens, petites molécules, alternatifs thérapeutiques.*

ABSTRACT

Colibacillosis, or Escherichia coli (E. coli) infection, is a frequent and important bacterial infection in veterinary pathology. E. coli is one of the major bacterial pathogens in swine. This type of pathology is treated on the basis of antibiotic therapy. Despite this, the effectiveness of this treatment to control and limit the spread of this pathogen was contested due to the rise of bacterial antibioresistance.

The global increase of antibioresistance and the shortage of new molecules available in human medicine to treat infections caused by multi-resistant Gram-negative bacteria has led to the rehabilitation of colistin as a last-resort antibiotic. However, the use of this antibiotic has never left the veterinary circuit, and particularly pig farms, thus controlling colibacillary diarrhea which generate significant economic losses for farmers. The main objective of this thesis is to reduce significantly the amount of colistin used in pig farms by developing innovative concepts based on the potentiation of colistin by antimicrobial peptides, and administration of colistin. alone or in combination with bacteriocins in nanoparticles (50-100 nm). These formulations will be released directly in the infection site, and have the advantage to resist to the gastro-intestinal environment.

Keywords: *Nanoparticles, colistin, Escherichia coli, antibacterial resistance, antimicrobial peptides, small molecules, therapeutic alternatives*

« L'enthousiasme est à la base de tout progrès »

Henry Ford, Homme d'affaire,

Industriel (1863 - 1947)

Remerciements

Il était une fois, dans une contrée très éloignée, une fille qui voulut entreprendre une grande aventure...

L'histoire qui commence ainsi, est riche en péripéties. Dans celle-ci, je n'ai pas été seule car différentes personnes m'ont apporté leur aide et m'ont permis de mener l'histoire à son terme. C'est l'occasion pour moi de les remercier.

En tout premier lieu, je tiens particulièrement à remercier Mme Chantal Pichon et Mme Nadia EVERARET pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude pour votre disponibilité et votre présence aujourd'hui. Je tiens également à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture du manuscrit.

Mes plus sincères et chaleureux remerciements vont à l'endroit de mon directeur de thèse, Dr. Rabah BOUKHERROUB. Pour son encadrement, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour sa chaleur humaine, pour son rigueur scientifique, pour son temps qu'il ne compte pas, pour ses encouragements, pour...J'ai de la chance de vous avoir eu comme directeur. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté aussi bien sur le plan scientifique et sur le plan humaine.

Mes remerciements vont également au Professeur Djamel DRIDER, mon co-directeur de thèse, Je vous remercie, pour votre confiance, pour votre disponibilité, pour votre apport scientifique et pour m'avoir pas épargné votre temps. Mes remerciements les plus sincères que je voudrais formuler à votre endroit.

Au Dr. Mohammed AMICHE, examinateur,

Recevez l'expression de ma profonde reconnaissance, pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Pr. Pascal DHULSTER, examinateur,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'évaluer ce travail, soyez-en chaleureusement remercié.

Au Dr Yanath BELGUESMIA, qui m'a aidé toujours, et pour les grandes moments vécus ensemble surtout les derniers temps pour son énorme patience et son humour. C'est une

Remerciements

enorme chance pour un jeune chercheur de travailler à ses côtés .je considère comme un frère.

En sachant que la liste est immense, et comme je ne voudrais oublier personne, je remercie de façon globale, tous les doctorants (Nuria, Ludivine, Mahammed, Rabiaa) au sein de l'Institut Charles Violette et tous les membres de l'equipe NanoBioInterfaces à la CNRS.

Je dédie cette thèse

A mes parents

Merci pour votre confiance en moi et votre soutien sans faille. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises. Sans vous je ne serais probablement pas là aujourd'hui et je ne vous remercierai jamais assez d'avoir tout fait pour que je puisse réaliser mes études dans les meilleures conditions possibles. Cette thèse est le témoignage de ma reconnaissance et de tout mon amour.

A mes Frères et mes sœurs,

Merci d'être toujours présent pour moi. Grâce à vous je sais que j'aurai toujours quelqu'un sur qui compter. Je suis fière de vous.

A mon mari, que je remercie par-dessus tout, qui a toujours été à mes côtés, qui m'a permis de me motiver pour finir cette thèse et qui m'a toujours soutenu et poussé à aller de l'avant même dans les moments difficiles. Je te remercie d'être là, pour moi.

Et enfin à mon futur bébé, je te remercie d'avoir été gentil et patient durant mes nuits d'études.

RESUME	5
ABSTRACT	6
REMERCIEMENTS.....	8
LISTES DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES ABREVIATIONS	25
INTRODUCTION	29
PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	32
I) Antibiotiques	33
I-1) La découverte des antibiotiques.....	33
I-2) Définition des antibiotiques	34
I-3) Mécanisme d'action des antibiotiques.....	34
I-4) Spectre d'activité des antibiotiques	36
I-5) Les grandes familles d'antibiotiques	38
II) Antibiorésistance	39
II-1) Problématiques de l'antibiorésistance.....	39
II-2) Définition	40
II-3) Mécanismes de résistance	41
II-4) Les différents mécanismes de la résistance bactérienne	44
II-5) Facteurs causal de l'antibiorésistance	45
II-5-1) Mésusage des antibiotiques	45
II-5-2) Surconsommation des antibiotiques	45
II-6) Conséquences de l'antibiorésistance.....	48
III) Bactéries multirésistantes (BMR)	49
III-1) Bactéries à Gram-positif multirésistantes.....	50
III-1-1) Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM).....	50
III-1-2) Streptococcus pneumoniae résistant aux pénicillines	50
III-1-3) Enterococcus faecium et Enterococcus faecalis	51
III-2) Bactéries à Gram-négatif multirésistantes.....	51

III-2-1)	Acinetobacter baumannii	51
III-2-2)	Pseudomonas aeruginosa	52
III-2-3)	Les entérobactéries	52
III-2-4)	Emergence de souche E. coli multirésistantes	55
III-2-5)	La diarrhée post-sevrage (DPS).....	56
IV)	La colistine : connaissances actuelles et utilisation clinique.....	61
IV-1)	Généralités	61
IV-2)	Structure chimique	61
IV-3)	Activité antibactérienne et mécanisme d'action	62
IV-4)	Spectre d'activité.....	64
IV-5)	Usages et problématiques	65
IV-5-1)	Usage en médecine humaine	65
IV-5-2)	Usage en médecine vétérinaire	68
IV-6)	Problèmes de toxicité	72
IV-6-1)	Néphrotoxicité	72
IV-6-2)	Neurotoxicité	75
IV-7)	Colistine et antibiorésistance.....	76
IV-7-1)	Méthode de détection de la résistance	76
IV-7-2)	Mécanisme de résistance à la colistine chez E. coli.....	77
IV-8)	Problématiques « One Health » liées à la colistine	83
IV-8-1)	Transmission et dissémination de mcr-1/mcr-2/mcr-3	83
V)	Solutions pour lutter contre les infections bactériennes.....	86
V-1)	Alternatives thérapeutiques	87
V-1-1)	Les Nanoparticules	87
V-1-2)	Les peptides antimicrobiens	91
V-1-3)	Les bactériocines	99
V-1-4)	Les plantes médicinales	103
V-1-5)	Les huiles essentielles (HE).....	107
V-1-6)	Les Acides organiques.....	111
V-1-7)	Les polyamines.....	114
PARTIE II :	OBJECTIFS DE LA THESE	118
PARTIE III :	MATERIELS ET METHODES.....	120
I)	Préparation du matériel biologique	121
I-1)	Acide alginique (dit « alginate »)	121
I-2)	Antibiotiques	122
I-3)	Les cellules eucaryotes	122

I-4)	Souches bactériennes	122
I-5)	Les huiles essentielles (HE).....	123
I-6)	Les acides organiques	125
I-7)	Les acides inorganiques	127
I-8)	Les polyamines	127
I-9)	Composés organiques	127
I-10)	Peptides antimicrobiens.....	128
I-11)	Enzymes	128
I-12)	Les colorants.....	129
I-13)	Les fixateurs	130
I-14)	Milieux de culture	130
II)	Appareils	131
III)	Techniques de préparation	132
III-1)	Préparation du tampon phosphate (PBS)	132
III-2)	Préparation du tampon acétate (pH 5).....	132
III-3)	Préparation d'une solution d'acide lactique	132
III-4)	Préparation d'une solution d'acide citrique	132
III-5)	Préparation des NPs alginate	132
III-6)	Préparation des NPs alginate fluorescentes	133
III-7)	Préparation des solutions pour l'analyse en HPLC.	133
III-8)	Préparation des solutions pour les tests microbiologiques	135
III-9)	Préparation de cellules eucaryotes pour la cytotoxicité	139
III-10)	Préparation de la culture bactérienne	140
III-11)	Préparation des solutions pour l'imagerie MET	141
IV)	Méthodes de caractérisation du matériel biologique	142
IV-1)	Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL).....	142
IV-2)	Analyse thermogravimétrique (ATG)	142
IV-3)	Spectrophotomètre UV-Visible	143
IV-4)	Spéctres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR).....	143
IV-5)	Analyse par microscopie.....	143
IV-5-1)	Microscope Electronique à Balayage (MEB)	143
IV-5-2)	Microscope confocal (droit)-NIKON-A1-R	144
IV-5-3)	Microscopie à fluorescence-LEICA-AF6000-LX	144
IV-5-4)	Microscope Electronique en Transmission (MET).....	144
V)	Méthodes d'analyse du matériel biologique	145
V-1)	Spectrométrie de masse MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization masse spectrometry).....	145
V-2)	HPLC	146

V-3) Test de dosage des protéines bactériennes	146
V-4) Méthodes microbiologiques.....	148
V-4-1) Tests antibactériens	148
V-4-2) Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu solide.....	148
V-4-3) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par microdillution en milieu liquide	148
V-4-4) Détermination de la CMB en milieu solide	149
V-4-5) Courbe de cinétique de la mortalité	150
V-4-6) Test de cytotoxicité.....	151
V-4-7) Traitement enzymatique	152
V-4-8) Traitement à différents pH.....	153
PARTIE IV : RESULTATS ET DISCUSSION	155
I) Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'alginate.....	156
I-1) Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL).....	156
I-1-1) Taille des particules.....	156
I-1-2) Potentiel zêta	157
I-2) Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	157
I-3) Analyse thermogravimétrique (ATG)	160
I-4) Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	161
I-5) Diffraction des Rayons X (DRX)	162
I-6) Spectrometrie Photoélectronique X (XPS).....	163
I-7) Etude de la stabilité desNPs alginate	164
I-7-1) Stabilité au cours du stockage à pH 7.....	164
I-8) Etude de marquage et d'internalisation des NPs alginate	166
I-8-1) Marquage fluorescent des NPs alginate et caractérisations	166
I-9) Imagerie par fluorescence d'E. coli exposées aux NPs alginate	168
II) Développement de formulations antibiotiques à base de colistine + nanoparticules d'alginate et de petites molécules.....	171
II-1) Combinaison de la colistine avec des NPs alginate.....	173
II-1-1) Caractérisations des NPs alginate+colistine	173
II-1-2) Détermination de la quantité maximale de la colistine adsorbée à la surface des NPs alginate. ..	177
II-1-3) Détermination des diamètres d'inhibition (DI).....	179
II-1-4) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	181
II-1-5) Résultats des activités anti-E. coli des solutions de colistine	185
II-1-6) Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la colistine	186
II-1-7) Tests de cytotoxicité des NPs d'alginate+colistine.....	188
II-1-8) Dosage des protéines	189

II-2) Combinaison de la colistine avec des NPs alginate et des polyamines	191
II-2-1) Tests d'activité antibactérienne	191
II-2-2) Test de cytotoxicité des NPs alginate +colistine +spermine.....	194
II-3) Combinaison de la colistine avec des NPs d'alginate et des huiles essentielles	195
II-3-1) Test de cytotoxicité des huiles essentielles.....	196
II-3-2) Test d'activité antibactérienne.....	197
II-3-3) Test de la cytotoxicité des NPs alginate + colistine + huile essentielle	203
II-4) Combinaison de la colistine avec des NPs alginate et l'acide lactique	204
II-4-1) CMI de la colistine +NPs alginate + A. lactique	204
II-4-2) Test de la cytotoxicité des NPs alginate + colistine + acide lactique	206
II-5) Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide de la colistine dans des différentes combinaisons.....	207
II-6) Courbe de mortalité d'E. coli 184.....	208
II-7) Imagerie par Microscopie Electronique à Transmission (MET)	209
II-8) Stabilité des NPs alginate+colistine à différents pHs	212
II-9) Stabilité des NPs alginate+colistine après traitement enzymatique.....	214
III) Développement des formulations antibiotiques à base des peptides antimicrobiennes (E20, DRS-B2 et HB2)	217
III-1) Développement des formulations antibiotiques à base de la fraction E20	217
III-1-1) Analyse en spectrométrie de masse MALDI-MS	218
III-1-2) Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)	219
III-1-3) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'E20	219
III-1-4) Combinaison d'E20 avec des NPs alginate	221
III-1-5) Dosage des protéines	226
III-1-6) Imagerie par microscope électronique à transmission (MET).....	227
III-1-7) Combinaison d'E20 avec des NPs alginate et des huiles essentielles.....	229
III-1-8) Combinaison de E20 avec des NPs alginate et des acides organiques	233
III-1-9) Combinaison d'E20 avec des NPs alginate et la colistine	236
III-1-10) Stabilité des NPs alginate+E20 à différents pHs	240
III-1-11) Stabilité des NPs alginate + E20 après traitement enzymatique.....	243
III-2) Développement des formulations antibiotiques à base de DRS-B2 et HB2.....	246
III-2-1) Détermination de l'activité antibactérienne de DRS-B2 et HB2	246
III-2-2) Quantification de DRS-B2 et HB2 adsorbés sur les NPs alginate par HPLC.....	248
III-2-3) Combinaison de DRS-B2/ HB2 avec des NPs alginate	251
III-2-4) Combinaison de DRS-B2/ HB2 avec des NPs alginate + menthol /acide lactique.....	252
III-2-5) Activité hémolytique des NPs alginate, DRS-B2 et HB2.....	256
III-2-6) Test de cytotoxicité de DRS-B2 et HB2 sur les lignées deux cellulaires HT-29 et IPEC-1 ...	258
III-2-7) Stabilité des NPs alginate + DRS-B2 à différents pHs	264
III-2-8) Stabilité des NPs alginate+DRS-B2 après traitement enzymatique.....	266

Table des matières

PARTIE V : DISCUSSION GENERALE269

PARTIE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES276

ANNEXE280

REFERENCES.....288

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Consommation d'antibiotiques en ville dans un panel représentatif de pays selon ANSM 2017.	46
Tableau 2: Consommation d'antibiotiques à l'hôpital dans un panel représentatif de pays	47
Tableau 3: Classification des peptides antimicrobiens en fonction de leurs structures.	93
Tableau 4 : Propriété des extraits de plantes médicinales.....	106
Tableau 5: Actions différenciées des acides organiques.....	114
Tableau 6 : Souches bactériennes utilisées au cours de ce travail.	123
Tableau 7: Courbe de calibration et régression linéaire pour les différents principes actifs.	135
Tableau 8 : Solutions des NPs alginate/ colistine /HE.....	136
Tableau 9 : Solutions des NPs alginate/ colistine /polyamines.....	136
Tableau 10 : Solutions des NPs alginate/ colistine /E20.....	137
Tableau 11 : Solutions des NPs alginate + E20 + HE / acide organique	137
Tableau 12: Solutions des NPs alginate + DRS-B2 + menthol /Acide lactique.	138
Tableau 13 : Solutions des NPs alginate + HB2 + menthol /Acide lactique.	139
Tableau 14 : Pertes de masse des NPs alginate de sodium par thermogravimétrie.	161
Tableau 15 : Mesures DDL des NPs alginate+colistine à différents ratios.	173
Tableau 16 : Concentration de colistine adsorbée sur les NPs alginate après dialyse.	179
Tableau 17 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des différentes solutions de la colistine sur 3 souches d' <i>Escherichia coli</i>	182
Tableau 18 : Diamètre d'inhibition des souches <i>Escherichia coli</i> avec la colistine.	186
Tableau 19 : CMI de la colistine avec des NPs alginate vis-à-vis des souches <i>E. coli</i>	187
Tableau 20 : Activité antibactérienne des solutions des NPs alginate +colistine + polyamine sur <i>E. coli</i> 184.....	192
Tableau 21 : CMI des solutions ACSd avec <i>E. coli</i> 184.....	193
Tableau 22 : Activités antibactériennes des solutions des NPs alginate +colistine + huile essentielle sur <i>E. coli</i> 184.....	200
Tableau 23 : CMI des différentes solutions d'acide lactique sur 2 souches d' <i>E. coli</i>	205
Tableau 24 : CMI et CMB des différentes solutions de la colistine avec la souche <i>E. coli</i> 184.	207
Tableau 25 : Effets du pH sur l'activité antagoniste des NPs alginate+Colistine avec l'acide lactique ou le menthol sur <i>E. coli</i> 184(<i>mcr</i> ⁻¹).....	213

Tableau 26 : Effets des enzymes digestives sur l'activité de la colistine+NPs alginate +acide lactique ou menthol sur *E. coli* 184(mcr-1⁺). 215

Tableau 27: Mesure de la taille et de la charge de surface des NPs alginate avant et après association avec E20 sur leur surface..... 219

Tableau 28 : Concentration minimale inhibitrice de la colistine et de l'extrait E20 contre un panel de souches d'*E. coli*. 220

Tableau 29 : Diamètre d'inhibition de la combinaison E20 +NPs alginate à différents pH avec *E. coli* 184. 222

Tableau 30 : Valeurs des CMI des deux solutions (NPs alginate+ colistine et NPs alginate + E20) sur 10 souches d'*E. coli*. 223

Tableau 31 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait E 20 combiné avec les huiles essentielles et des NPs alginate..... 230

Tableau 32 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait E20 combiné avec des NPs alginate + acide (lactique / citrique) 234

Tableau 33 : Diamètre d'inhibition anti-ER184 des combinaisons E20+colistine..... 237

Tableau 34 : CMI de la combinaison E20 + colistine vis-à-vis d'*E. coli* 184. 238

Tableau 35 : Effets du pH sur l'activité antagoniste des NPs alginate + E20 + acide lactique ou le menthol/thymol sur *E. coli* 184(mcr-1⁺). 242

Tableau 36 : Effets des enzymes digestives sur l'activité des NPs alginate+ E20 +acide lactique ou menthol sur *E. coli* 184(mcr-1⁺). 245

Tableau 37 : Concentration minimale inhibitrice des peptides (DRS-B2 et HB2) testés sur 2 souches d'*E. coli*. 247

Tableau 38 : Concentration de DRS-B2 adsorbée sur les NPs alginate après dialyse. 249

Tableau 39 : Concentration de HB2 adsorbée sur les NPs alginate après dialyse. 250

Tableau 40 : CMI de peptide DRS-B2 + NPs alginate (DRS-B2+NPs Alg) à différentes concentrations testées sur 2 souches d'*E. coli*..... 252

Tableau 41: CMI de peptide HB2+NPs alginate (HB2+NPsAlg) à différentes concentrations testées sur les 2 souches d'*E. coli* cibles utilisées. 252

Tableau 42: CMI des mélanges des NPs alginate avec le menthol et le peptide DRSB2 de différentes concentrations testés sur 2 souches d'*E. coli*. 253

Tableau 43: CMI des mélanges des NPs alginate avec le menthol et le peptide HB2 à différentes concentrations testés sur 12 souches d'*E. coli*. 253

Tableau 44 : CMI des mélanges des NPs alginate avec l'acide lactique et le peptide DRS-B2 à différentes concentrations testés sur 2 souches d'*E. coli*..... 254

Tableau 45 : CMI des mélanges des NPs alginate avec l'acide lactique et le peptide HB2 à différentes concentrations testés sur 2 souches d'*E. coli*. 254

Tableau 46: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides (DRS-B2+HB2) avec des NPs alginate + menthol/acide lactique testés sur 2 souches d'*E. coli*. 256

Tableau 47 : Effets du pH sur l'activité des NPs alginate + DRS-B2 + acide lactique ou le menthol sur *E. coli* 184 (*mcr-1*). 265

Tableau 48 : Effets des enzymes digestives sur l'activité de DRS-B2+ NPs alginate + acide lactique ou le menthol sur *E. coli* 184(*mcr-1*⁺). 267

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Illustration montrant l'absence de nouvelles découvertes dans le domaine des antibiotiques ces dernières années	33
Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques sur une bactérie selon Singh et al. 2006	35
Figure 3 : Action d'un antibiotique sur une bactérie.....	41
Figure 4 : Une bactérie résistante aux antibiotiques	41
Figure 5 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries.	43
Figure 6 : Pression de sélection des antibiotiques	43
Figure 7 : Les différents mécanismes de la résistance bactérienne	44
Figure 8 : Evolution de la consommation d'antibiotiques en ville mesuré en nombre de doses journalières définies (DDJ) pour 1000habitants/jour entre 2000 et 2016	48
Figure 9 : Nombre de décès /an en 2050 dans le monde causé par les bactéries multirésistantes.....	49
Figure 10 : Evolution des proportions de souches d'E. coli non sensibles (I+R) à l'enrofloxacin	56
Figure 11: La genèse multifactorielle de la diarrhée post-sevrage chez les porcs implique une interaction entre des facteurs prédisposant contributeurs et déterminants	57
Figure 12 : Représentation schématique des étapes impliquées dans la pathogenèse de la diarrhée post-sevrage chez le porc	58
Figure 13 : Résultats des EpidemioColis.	59
Figure 14 : Structure de la colistine A et B (polymyxine E1et E2). Polymyxine E1 (colistine A) : R : acide 6-méthylheptanoïque ; DAB ; acide polymyxine E2 (Colistine B) : R : acide 6-méthylheptanoïque ; DAB : acide α - γ diamino butyrique ; Thr : thréonine ; Leu : leucine ...	62
Figure 15 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane interne des bactéries à Gram-négatif. LPS: lipopolysaccharide.....	63
Figure 16 : Photo de microscopie électronique à transmission de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P.aeruginosa</i>) (A) non traité à un grossissement de 74 000 \times ; (B) traité avec 25 μ g de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 74000 \times ; (C) traité avec 25 μ g de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 190 000 \times	64
Figure 17 : Tendances de la consommation de polymyxines dans le secteur hospitalier, pays de l'UE/EEE, 2012-2016 (exprimé en DDD pour 1 000 habitants par jour) (ECDC, 2017)	67

Figure 18 : Répartition de groupe ATC J01X antibactériens dans le secteur hospitalier en France, année 2017(ECDC 2018). 67

Figure 19 : Données de vente des polymyxines pharmaceutiques pour les animaux de production, en mg/PCU, selon la forme pharmaceutique, en Europe pour 2016. A : les résultats globaux pour l’Europe ; B : le détail par pays (EMA : European Médecines Agency 2018). PCU : Population Correction Unit qui tient compte de la population animale ainsi que du poids estimé de chaque animal au moment du traitement antibiotique..... 69

Figure 20 : Vente de polymyxines à destination des animaux dans les pays de l’UE entre 2010 et 2016 . PCU : « Population Correction Unit » qui tient compte de la population animale ainsi que du poids estimé de chaque animal au moment du traitement antibiotique. 71

Figure 21 : Principaux mécanismes cellulaires responsable de la néphrotoxicité induite par la colistine (et potentiellement le CMS)..... 75

Figure 22 : Modification du lipide A et résistance aux polymyxines. A: Modification du LPS responsable de la diminution de l’électronégativité de la membrane externe et de la répulsion des polymyxines par ajout de pEtN et/ou L-Ara4N ; pEtN : phosphoéthanolamine; L-Ara4N :4-amino-4-désoxy-L-arabinose. KDO: 2-céto-3-désoxyoctonate..... 78

Figure 23 : B : Structures chimiques du lipide A natif et du lipide A modifiée. Les enzymes responsables des modifications du lipide A sont indiquées dans les rectangles colorés. D’après (Dortet et al. 2016). pEtN : phosphoéthanolamine; L-Ara4N :4-amino-4-désoxy-L-arabinose. KDO: 2-céto-3-désoxyoctonate..... 78

Figure 24 : Diagramme des gènes principaux impliqués dans la résistance à la colistine pour les bactéries à Gram négatif. 79

Figure 25 : Circulation d’*E. coli* résistant à la colistine, porteur du gène *mcr-1*, entre animaux, environnement et aliments. 85

Figure 26: Les différentes voies des activités de défenses portées par des peptides antimicrobiens : régénération cellulaire, immun modulation des cellules lymphatiques, expression dans des pathologies, activité sur des médicaments et autres activités directes. .. 95

Figure 27 : Mécanismes de résistance des bactéries aux PAMs. a) La dégradation protéolytique ; b) Les mécanismes de piégeage du peptide ; c) Le transport actif utilisant les pompes à efflux ; d) altérations de la charge du peptide ou de la membrane des microorganismes. 99

Figure 28 : Principaux mécanismes d’action des bactériocines produites par les bactéries à Gram- positif. 102

Figure 29 : Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie : certains principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires ..	104
Figure 30 : Mécanisme d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne	110
Figure 31 : Microscopie électronique à balayage (MEB) d' <i>E. coli</i> K12: A : <i>E. coli</i> non traitée ; B : <i>E. coli</i> traitée par l'HE d'origan ; C: <i>E. coli</i> traitée par le thymol ; D : <i>E. coli</i> traitée par l'HE de girofle ; E : <i>E. coli</i> traitée par l'eugénol.	111
Figure 32 : Mode d'action des acides organiques sur une cellule bactérienne.....	113
Figure 33 : Synthèse de polyamines.....	115
Figure 34 : Rôles et propriétés des polyamines	116
Figure 35 : Structure de l'acide alginic, A: acide-L-guluronique ; B : acide-D-mannuronique	121
Figure 36 : Chaîne de préparation des NPs alginate.	133
Figure 37 : Préparation des culots bactériens.....	141
Figure 38 : Distribution de taille par volume et par intensité des NPs alginate dans l'eau .	156
Figure 39 : Distribution selon le potentiel zêta de la solution des NPs alginate.	157
Figure 40 : Micrographie MEB des NPs alginate.	158
Figure 41 : Nombre et taille des NPs alginate de trois formes différentes.....	159
Figure 42 : Taille moyenne des NPs alginate des différentes formes.	159
Figure 43 : Courbe thermogravimétrique des NPs alginate.	160
Figure 44 : Spectres FTIR des NPs alginate et l'alginate de sodium brut.....	162
Figure 45 : DRX des NPs alginate et l'alginate de sodium brut.	163
Figure 46 : Spectres XPS (C1s) à balayage étroit des NPs alginate: C-C (bleu); C-O (rouge); C=O (bleu foncée).....	164
Figure 47 : Evolution de la taille et de l'indice de dispersion des NPs alginate au cours du temps.	165
Figure 48 : Structure de la rhodamine B adsorbée sur l'alginate de sodium (414).....	167
Figure 49 : A) Spectres d'absorption UV-visible des NPs alginate (0.5 mg.mL^{-1}) avant (rouge) et après (bleu) dialyse; B) Microscopie confocale des NPs alginate-RhB.....	168
Figure 50 : Observation en microscopie à fluorescence des cellules bactériennes (<i>E. coli</i> 184) après 18 heures d'incubation avec des NPs alginate–RhB.	169
Figure 51 : Microscopie à fluorescence des cellules d' <i>E. coli</i> incubées avec des NPs alginate marquées à la rhodamine B ; A : 1 heure d'incubation ; B : 2 heures d'incubation ; C : 3 heures d'incubation ; D : 4 heures d'incubation.....	169

Figure 52 : La dégradation thermique des NPs alginate (NPsAlg), de la colistine et de mélange NPs alginate+colistine ; A: Données d'analyse thermogravimétrique (TGA), elle présente le pourcentage de perte de masse en fonction de la température B : Données de Thermogravimétrie Différentielle (DTG). 175

Figure 53 : Spectres FTIR des NPs alginate, de la colistine et des NPs alginate +colistine. 177

Figure 54 : Variation de l'aire du pic des différentes concentrations de la colistine avant dialyse (rouge) et après dialyse (vert). 178

Figure 55 : Activité anti-*E. coli* de 3 solutions des NPs alginate + colistine évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé..... 180

Figure 56 : Activité antibactérienne sur boîte de gélose des solutions des NPs alginate + colistine avec *E. coli* 184 et *E. coli* CIP 7628. 180

Figure 57 : Mode d'action de la polymyxine B contre BGN ciblant l'enveloppe externe (434). 183

Figure 58 : Test de cytotoxicité des différentes solutions de la colistine sur la lignée cellulaire IPEC-1..... 189

Figure 59 : Test de cytotoxicité des différentes solutions de la colistine sur la lignée cellulaire HT-29. 189

Figure 60 : Fuite de protéines d'*Escherichia coli*. Concentration en [Colistine] = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, [NPs alginate] = 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, solution [NPs alginate+Colistine]= (CMI= 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). 190

Figure 61 : Test de cytotoxicité des différentes solutions de la colistine et de la spermine sur la lignée cellulaire HT-29..... 195

Figure 62 : Test de cytotoxicité des différentes huiles essentielles sur la lignée cellulaire HT-29..... 196

Figure 63 : CMI des différentes solutions obtenues sur les deux souches d'*E. coli* (184 et ATCC8739)..... 198

Figure 64 : Test de cytotoxicité des différentes combinaisons des NPs alginate + colistine + huiles essentielles sur la lignée cellulaire HT-29. 204

Figure 65 : Test de cytotoxicité de la combinaison de la colistine+NPs alginate + acide lactique sur les deux lignées cellulaires IPEC-1 et HT-29..... 206

Figure 66 : Effet des différentes solutions de colistine sur la viabilité des souches d'*E. coli* 184..... 208

Figure 67 : Micrographies électroniques à transmission d'*E. coli* 184 traitée avec différentes solutions. A-C : Contrôle ; D : NPs alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); E-F : Colistine; G-H : NPs

alginate+colistine ; I-J : NPs alginate+ colistine+acide lactique ; K-L : NPs alginate + colistine + menthol.....	210
Figure 68 : Spectre MALDI-TOF-MS de l'extrait E20 avant et après dialyse (analyse réalisée par Mme Ioana Hosu)	218
Figure 69 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1.....	225
Figure 70 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire humaine HT-29.....	225
Figure 71 : Fuite de protéines de l' <i>E. coli</i> 184, [E20]=60µg .mL ⁻¹ ; [NPs alginate]=500µg.mL ⁻¹ ; solution [NPs alginate (500µg.mL ⁻¹) +E20 (4 µg.mL ⁻¹)]= (CMI= 4 µg.mL ⁻¹).....	226
Figure 72 : Micrographie électronique à transmission (MET) de la souche <i>E. coli</i> 184 traitée avec différentes solutions antimicrobiennes ; A-B: Contrôle; C: NPs Alg (500µg.mL ⁻¹); D-E : E20; F-G: NPs Alg+E20.	228
Figure 73 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire IPEC-1.	232
Figure 74 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire humaine HT-29.....	233
Figure 75 : Cytotoxicité de l'extrait E20 associé avec l'acide lactique et l'acide citrique sur les lignées cellulaires IPEC-1 et HT-29.	236
Figure 76 : Cytotoxicité de la colistine associée avec E20 sur la lignée cellulaire IPEC-1..	240
Figure 77 : Variation de l'aire du pic des différentes concentrations de DRS-B2 avant et après dialyse.	249
Figure 78 : Variation de l'aire du pic des différentes concentrations de HB2 avant et après dialyse.....	250
Figure 79 : Effet des NPs alginate seules ou en combinaison avec DRS-B2/HB2 sur l'hémolyse des globules rouges : Les érythrocytes humaines.....	257
Figure 80 : Cytotoxicité des différentes solutions de HB2 sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1.....	258
Figure 81 : Cytotoxicité des différentes formulations de DRS-B2 sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1.....	259
Figure 82 : Cytotoxicité <i>in vitro</i> de différentes formulations de HB2 et DRS-B2 sur la lignée cellulaire IPEC-1.....	260
Figure 83 : Cytotoxicité des différentes formulations de HB2 sur la lignée cellulaire humaine HT-29.	261

Figure 84 : Cytotoxicité des différentes formulations de DRS-B2 sur la lignée cellulaire HT-29. 262

Figure 85 : Cytotoxicité *in vitro* des différentes formulations de HB2 et DRS-B2 sur la lignée cellulaire HT-29. 263

Figure 86 : Schéma de principe de fonctionnement de la microscopie électronique en transmission (658). 283

Figure 87 : Courbe d'étalonnage générée à partir des solutions standards de la colistine dissoute dans l'eau. La droite obtenue correspond à l'aire des pics de la colistine dans l'eau à 215 nm. 285

Figure 88: Courbe d'étalonnage générée à partir des solutions standards de peptide DRS-B2 dissout dans l'eau. La droite obtenue correspond à l'aire des pics de DRS-B2 dans l'eau à 215 nm. 285

Figure 89 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir des solutions standards de peptide HB2 dissout dans l'eau. La droite obtenue correspond à l'aire des pics de HB2 dans l'eau à 215 nm. 286

LISTE DES ABREVIATIONS

A

A. Lactique :	Acide lactique
A. Citrique :	Acide citrique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide Ribonucléique
<i>A. baumannii:</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ALEA:	Animal Level of Exposure to Antimicrobials
AMEG:	Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé
ATP:	Adénosine Triphosphate

B

BGN :	Bactérie Gram Négatif
BGP :	Bactérie Gram positif
BHI:	Braint Heart Infusion
BL :	Bactéries Lactiques
bla Z :	gène de résistance aux β -lactamines
BLSE :	Bêta-Lactamases à Spectre Etendu
BMR :	Bactéries Multi-Résistantes

C

CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CMS:	Colistine Méthane Sulfate

D

DDD:	Defined Daily Doses
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DRS-B2:	Dermaseptine B2
DPS :	Diarrhée Post-Sevrage
E	
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC:	European Centre for Disease Prevention and Control
ED :	Edema Disease
EDP :	<i>Enterococcus</i> dépendant de la vancomycine
ERG :	<i>Enterococcus</i> résistant aux glycopeptides
ERV :	<i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine
EMA:	European Medicines Agency
ESVAC:	European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption
F	
FPM :	Force Proton Motrice
H	
HE :	Huile Essentielles
HIV :	Virus de l'Immunodéficience humaine
HT-29:	Human colorectal cancer cells
I	
I :	Intermédiaire
IgA:	Immunoglobulines A
IM:	Intramusculaire
IN :	infections nosocomiales
IPAS :	Ilot de pathogénités
IPEC-1:	Porcine Intestinal Epithelial Cells
IRA :	Insuffisance Rénale Aigue
ITU :	Infection du Tractus Urinaire
IV :	Intraveineuse
K	
KDa:	Kilo-Daltons

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*

L

L-Ara-4N: 4-amino-4-desoxy-L-arabinose

L.Monocytogenes: *Listeria monocytogenes*

LPS: Lipopolysaccharide

LT: Toxines Thermolabiles

M

MBL: Metallo- β -Lactamases

mcr-1: mobilized colistin resistance

MDR : Multi-Drug-Resistant

Mec A : gène de résistance à la méticilline

N

NPs Alg : Nanoparticules d'alginate

NDM: New-Delhi-Metallo- β -lactamase

NNOS : oxyde nitrique synthase neuronal

NPs alginate : Nanoparticules d'alginate

O

OligoG(G) : Oligosaccharide riche en acide Guluronique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAM : Peptides Anti-Microbiens

P. aeruginosa: *Pseudomonas Aeruginosa*

PCU : Population Correction Unit

PETN: Phosphoéthanolamine

PLP : Protéines de Liaison aux Pénicillines.

R

R : Résistante

RCP : Résumé Caractéristique du Produit

S

Liste des abréviations

S :	Sensible
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
ST:	Toxines Thermostables
SARV :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine
U	
UE :	Union Européenne
V	
Van :	gène de résistance à la vancomycine

INTRODUCTION

Face aux agressions microbiennes l'homme a développé tout au long des siècles de nombreuses stratégies préventives et/ou thérapeutiques couronnées de plus ou moins de succès. Cependant un tournant majeur dans cette lutte perpétuelle a été franchi avec la découverte de nouvelles molécules capables de combattre certains de ces microorganismes parmi les plus problématiques ; il s'agit des antibiotiques. Depuis leur découverte, au début du XXème siècle par Sir Alexander Fleming, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et ont contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques a considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables.

Les colibacilloses sont des infections à *Escherichia coli* (*E. coli*), une bactérie intestinale des mammifères, responsable d'infections fréquentes et importantes en médecine vétérinaire. En 2015, 72% des antibiogrammes réalisés par le réseau d'épidémiologie et de surveillance d'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales « RESAPATH » (<https://resapath.anses.fr/>) ont porté sur cette bactérie.

E. coli est l'un des principaux agents bactériens pathogènes chez le porc. En fonction de sa virulence, il peut causer diverses maladies, y compris des maladies entériques telles que la diarrhée néonatale, diarrhée post-sevrage (DPS), et la maladie de l'œdème (ED), mais aussi des infections systémiques telles que la septicémie, la polysérite, les mammites et les infections des voies urinaires (1). Ces maladies entraînent une morbidité et une mortalité significative accompagnées d'un retard de croissance (2). Ce type de pathologie est traité sur la base d'une antibiothérapie définie. L'efficacité de cette antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme.

Comme nous le verrons, certaines pratiques favorisent l'apparition de résistances bactériennes vis-à-vis des antibiotiques utilisés, réduisant ainsi drastiquement les possibilités thérapeutiques pour lutter contre les infections. Les autorités publiques ont depuis quelques années, et à l'échelle mondiale, pris conscience de ce phénomène et de la menace qu'il représente depuis plusieurs décennies. Plus récemment, la recherche d'alternatives

thérapeutiques est mise en avant au travers de deux plans nationaux, appelés Ecoantibio mis en place en 2012 puis 2017.

L'antibiorésistance, qui définit l'aptitude des bactéries à résister à l'action d'un (ou de plusieurs) antibiotique(s), est un sujet de préoccupation de santé publique majeur au niveau international. L'évolution et la diffusion des résistances aux antibiotiques, notamment pour des bactéries pathogènes a provoqué des difficultés thérapeutiques pour certaines infections chez l'homme. Par ailleurs, ce phénomène ne touche pas seulement les populations humaines mais également les animaux et l'environnement, c'est la notion de la seule santé, ou concept du « *One Health* ».

L'augmentation globale de la résistance s'accompagne d'une diminution du nombre de découvertes de nouvelles molécules antibiotiques depuis deux décennies, pourtant nécessaires pour pallier à ce problème. La crainte principale est l'apparition de nouvelles résistances pour lesquelles l'arsenal thérapeutique deviendrait très limité, voire inexistant. En l'absence de nouveaux traitements disponibles, une alternative possible réside dans l'utilisation de molécules antibiotiques anciennes dont l'usage avait été abandonné. Les antibiotiques les plus couramment administrés comprennent des polypeptides et des aminoglycosides. Parmi ces molécules la colistine qui est un antimicrobien polypeptidique fréquemment utilisé dans la production porcine. Cet antibiotique de la famille des polymyxines a été découvert en 1950 par Y. Koyama à partir de cultures de *Bacillus colistinus* (3). Il agit au niveau de la membrane par une action détergente, entraînant la formation de pores, et donc la fuite des éléments vitaux de la bactérie. A partir des années 1970, la colistine a été délaissée en médecine humaine en raison de ses effets secondaires, notamment une certaine néphrotoxicité (4). Depuis environ une décennie, la colistine a été réintroduite en thérapeutique humaine par manque d'options thérapeutiques pour traiter les infections humaines dues aux bactéries à Gram-négatif. Parallèlement, la colistine est toujours restée un antibiotique largement utilisé chez les animaux d'élevage en médecine vétérinaire et particulièrement dans les élevages de porcs. Celle-ci permet de contrôler les diarrhées colibacillaires qui génèrent de la souffrance animale et des pertes économiques importantes pour les éleveurs, et ceci depuis des décennies. En 2013, selon Hemonic et al. 2014 (5, 6) sur un échantillon représentatif d'élevages porcins en France, 80% utilisaient des polymyxines chez les porcelets après le sevrage, 42% chez les cochons de lait et 15% chez les porcelets allaités. En 2010, il s'agissait principalement du traitement de troubles digestifs (6). Une étude comparative de l'utilisation

de la colistine entre 2010 et 2013 a révélé une réduction de l'usage de cet antibiotique durant cette période (5).

Du fait du retour de la colistine en médecine humaine comme traitement de dernière intention, des questions se sont posées à propos de l'impact de son usage intensif chez les animaux sur le développement de résistance pour cette molécule. Dès lors est apparu l'intérêt de trouver d'autres molécules, qui auraient un effet synergique, et qui pourraient permettre la réduction de la quantité de colistine dans le circuit vétérinaire. Parmi les alternatives envisagées, les peptides antimicrobiens (PAM), notamment les bactériocines, apparaissent comme des candidats intéressants, notamment en association avec des nanoparticules, des huiles essentielles ou des acides organiques. Ces associations pouvant élargir le spectre d'activité de la colistine, réduire sa toxicité, diminuer l'émergence de résistance et obtenir une activité accrue de façon synergique.

Les bactériocines sont des peptides, généralement de petite taille (<30kDa). Ce ne sont pas des antibiotiques mais possèdent des propriétés antibiotiques car elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. Les bactériocines diffèrent des antibiotiques par leur voie de synthèse ribosomale, contrairement aux antibiotiques synthétisés par voie enzymatique. Elles présentent une activité à des concentrations bien plus faibles que celles des antibiotiques et un spectre d'activité généralement plus restreint que celui des antibiotiques (7).

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par extraction mécanique (8). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits, mais également à partir de gommés qui s'écoulent du tronc des arbres (9).

Les nanoparticules, également appelées particules ultrafines (PUF), sont des molécules dont la taille varie entre 1 et 100 nanomètres ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} = 0,000000001 \text{ m}$). Elles sont donc plus grandes que des atomes et plus petites qu'une cellule.

Suivant le concept « *One Health* », l'optimisation de l'usage de la colistine et la prévention du développement des résistances à son encontre, est un axe de recherche qui se doit d'intégrer les problématiques touchant la médecine humaine mais également la médecine vétérinaire. Cette thèse s'inscrit dans ce contexte.

PARTIE 1 : Revue Bibliographique

I) Antibiotiques

I-1) La découverte des antibiotiques

La découverte du premier antibiotique, la pénicilline, par Sir. Alexander Fleming (1881-1955) ([10](#), [11](#)), a été faite de façon fortuite. Son spectre d'activité comprenait la plupart des bactéries Gram-positif, mais elle fut surtout, capable d'annihiler une souche microbienne de staphylocoque. Depuis cette découverte, plusieurs autres classes d'antibiotiques ont vu le jour. Comme nous le montre la **Figure 1**, entre les années 1940 et les années 1960, une panoplie de nouveaux antibiotiques ont été découverts. Cependant, il est également possible de constater que depuis 1987, il n'y a eu que très peu de nouvelles molécules qui ont été mises à la disposition des médecins pour traiter les infections bactériennes ([12](#)).

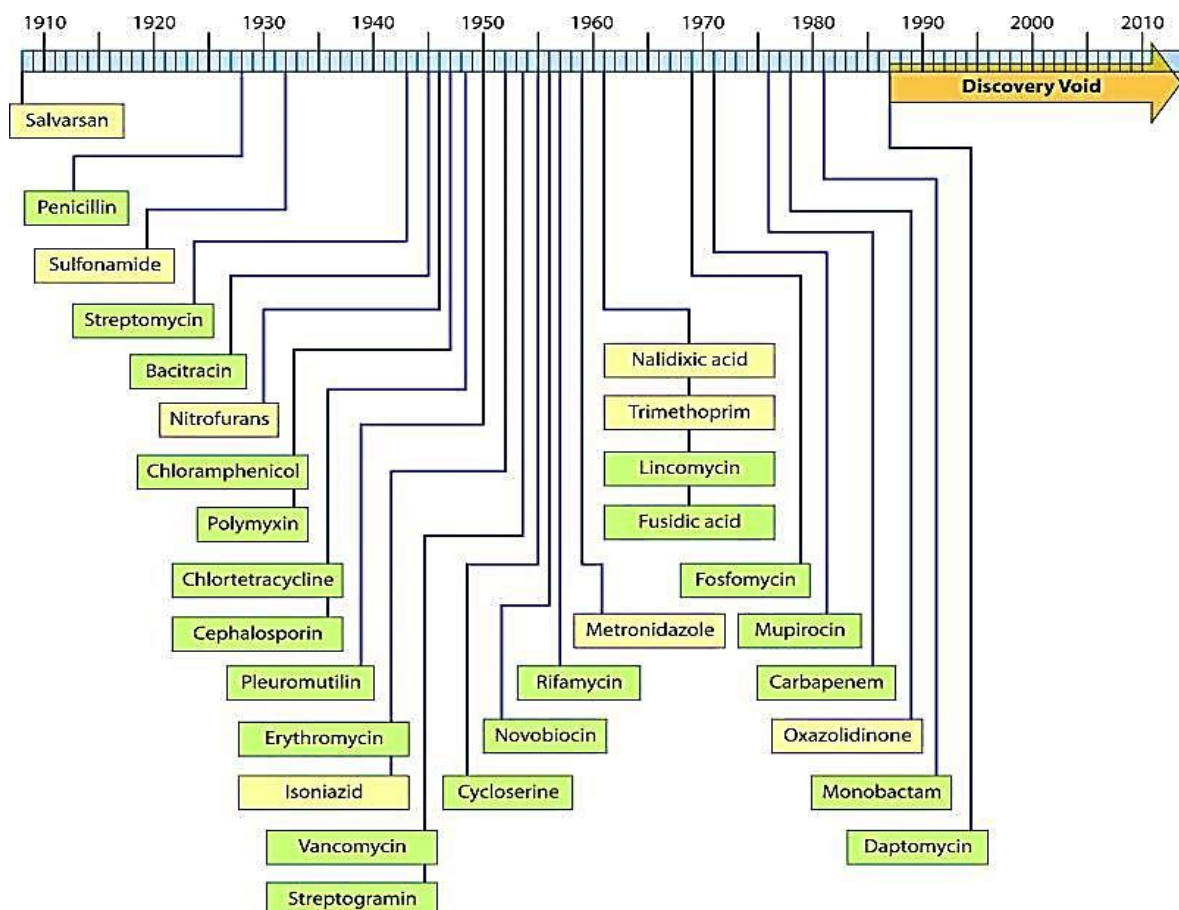


Figure 1: Illustration montrant l'absence de nouvelles découvertes dans le domaine des antibiotiques ces dernières années ([13](#)).

I-2) Définition des antibiotiques

Un **antibiotique** (du grec anti : « contre », et *bios* : « la vie »), est une substance antibactérienne d'origine biologique produite par des microorganismes, ou toutes substances chimiques utilisées pour tuer (bactéricide) ou empêcher la croissance des micro-organismes (action bactériostatique), en particulier des bactéries infectieuses. Toutefois aujourd'hui, la plupart de ces molécules sont synthétisées de manière semi-synthétique (12).

Il existe plusieurs définitions des antibiotiques.

Selon Waksman (1943) il s'agit de "toutes les substances chimiques produites par des microorganismes capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes" (14)

Selon Turpin et Velu (1957), les antibiotiques sont "Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimio thérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certaines êtres pluricellulaires" (15).

Ainsi le mécanisme d'action des antibiotiques va permettre de mieux comprendre leur spectre d'activité. C'est une caractéristique qualitative, qui se traduit par une action spécifique à l'échelle moléculaire sur une cible spécifique de la bactérie. Ces mécanismes d'action sont variés et permettent de distinguer les différentes classes d'antibiotiques.

I-3) Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés en fonction de leur mode d'action sur les bactéries (16). Les bactéries sont des organismes parmi les plus simples du monde vivant, ils sont unicellulaires et dénués de noyau « procaryotes ». Le cytoplasme est le milieu interne à la cellule, il contient le patrimoine génétique (ADN circulaire) et les éléments de la synthèse protéique. Chez les bactéries à Gram-positif, le cytoplasme est séparé de l'extérieur par une membrane cytoplasmique et une paroi cellulaire épaisse riche en peptidoglycane, alors que chez les bactéries à Gram-négatif, il est séparé du milieu extracellulaire par une membrane cytoplasmique interne (inner membrane), une paroi mince pauvre en peptidoglycane et une membrane externe (outer membrane)

Les antibiotiques agissent généralement sur un des éléments de la structure bactérienne. Ils sont classés en familles selon leurs modes d'action ou leur structure moléculaire. On peut

schématiquement regrouper les différentes familles d'antibiotiques autour de quatre mécanismes d'action principaux (**Figure 2**) (17-19).

- **Action sur la paroi bactérienne**

Les β -lactamines, les glycopeptides et la Fosfomycine bloquent la synthèse de la paroi par inhibition de la transpeptidase, ce qui inhibe la synthèse du peptidoglycane. Ceci empêche la formation de nouvelles bactéries et peut entraîner la destruction de celles déjà existantes.

- **Action sur la membrane cellulaire**

Ici l'antibiotique a des propriétés de surfactant qui lui permettent de s'insérer parmi les phospholipides de la membrane externe (bactéries à Gram-négatif). Cela perturbe la perméabilité membranaire (augmentation anormale) et permet la diffusion de substances hydrosolubles hors de la bactérie, ce qui entraîne sa destruction. Les polymyxines (lipopeptides cycliques) agissent suivant ce mode d'action.

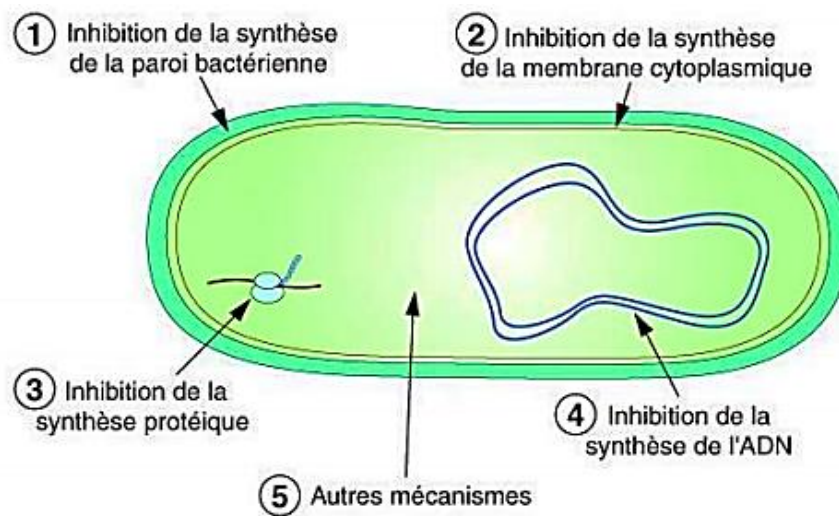


Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques sur une bactérie selon Singh et al. 2006 (20).

- **Action sur l'ADN**

Les fluoroquinolones agissent en se liant au complexe ADN-ADN gyrase bactérienne ce qui a pour effet d'inhiber la gyrase. Cette enzyme rajoute des super tours négatifs à l'ADN, indispensables à l'ouverture de la double hélice. Cela inhibe la réplication de l'ADN, indispensable à la formation de nouvelles bactéries, ainsi que la transcription. L'activité antibactérienne Gram-négatif passe surtout par l'inhibition des activités ADN gyrases tandis

que l'activité antibactérienne Gram-positif semble passer par le blocage de la topoisomérase IV.

- **Action sur la synthèse protéique**

Dans la bactérie, les macrolides se fixent sur les ribosomes pour perturber la synthèse protéique. En effet, les ribosomes bactériens (constitués de deux sous-unités 30S et 50S formant un ribosome 70S) sont différents des ribosomes eucaryotes (constitués de deux sous-unités 40S et 60S formant un ribosome 80S) offrant la possibilité d'avoir des substances dont l'action est très spécifique. Les tétracyclines (auréomycine) et les macrolides (érythromycine) agissent suivant ce mode d'action. Les macrolides agissent au niveau de la sous-unité 50S, les tétracyclines agissent sur la sous-unité 30S. Selon leur concentration, les antibiotiques ont un effet allant du ralentissement de la croissance bactérienne (effet bactériostatique) à la mort de la bactérie (effet bactéricide).

Certaines familles d'antibiotiques, en lien avec leur mode d'action sur la bactérie, ont des effets bactéricides et bactériostatiques pour des concentrations relativement proches. Ces familles sont dites bactéricides. Pour d'autres, les effets bactéricides sont visibles à des très fortes concentrations, qu'on ne peut pas atteindre en réalité *in vivo*. Ces familles sont dites bactériostatiques. Néanmoins, leur utilisation massive et/ou inappropriée durant le siècle dernier a conduit à l'émergence d'un phénomène naturel et inéluctable, l'antibiorésistance.

I-4) Spectre d'activité des antibiotiques

A chaque antibiotique est associée une liste d'espèces bactériennes sur lesquelles il est supposé être efficace : on parle de « spectre d'activité antibactérienne ». Le spectre d'activité des antibiotiques est évalué à l'aide de différents critères (21).

- **Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB)**

La détermination de la CMI est la méthode de référence afin de mesurer l'activité *in vitro* d'un antibiotique sur une bactérie donnée (22).

- La CMI est la concentration minimale d'antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible après 18 à 24 h d'incubation à 37°C.

- La CMB est la concentration minimale d'antibiotique qui élimine 99,9% des bactéries d'un *inoculum* standardisé à 10^5 - 10^6 bactéries/mL. (23).
- **Effet bactéricide ou bactériostatique**

Un antibiotique est dit bactéricide si le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 2 : l'antibiotique provoque alors la mort des bactéries.

Un antibiotique est dit bactériostatique si le rapport CMB/CMI est compris entre 4 et 16 : l'antibiotique inhibe la croissance des bactéries, sans les tuer.

Si le rapport CMB/CMI est supérieur à 16, la bactérie est dite tolérante à l'antibiotique (22, 23).

- **Souches sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistantes (R)**

Afin de faciliter l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro*, 3 catégories cliniques ont été définies permettant de classer les souches bactériennes comme **sensibles (S)**, **intermédiaires (I)** ou **résistantes (R)** à un antibiotique donné.

- Les souches **sensibles (S)** sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte, dans le cadre d'un traitement par voie systémique aux posologies recommandées dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP)
- Les souches dites **intermédiaires (I)** présentent un succès thérapeutique imprévisible : les résultats aux tests *in vitro* sont non prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches peuvent présenter :
 - un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, alors qu'une partie de ces souches est résistante au traitement *in vivo*.
 - un mécanisme de résistance dont l'expression est insuffisant pour les classer dans la catégorie (R), mais suffisamment faible pour obtenir un succès thérapeutique dans certaines conditions (à fortes concentrations ou fortes posologies).
- Les souches résistantes (R) sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique, quelle que soit la dose d'antibiotique utilisée.

Le spectre de l'antibiotique sur les différentes espèces bactériennes est un élément essentiel à prendre en compte lors de l'initiation d'une antibiothérapie.

I-5) Les grandes familles d'antibiotiques

De nombreux antibiotiques ont été découverts et la plupart ont été regroupés en plusieurs familles (24-26) :

- **Les β -lactamines**

Ce sont véritablement les premiers antibiotiques apparus car la pénicilline appartient à cette famille. Ils sont encore largement utilisés en cas d'absence d'allergie à la pénicilline. On y retrouve donc les dérivés de pénicilline, les céphalosporines et les carbapénèmes (utilisés en derniers recours en cas de résistance). Ils peuvent se présenter sous forme seuls ou accompagnés d'inhibiteurs de β -lactamase. Les plus connus d'entre eux actuellement sont l'amoxicilline et la Cloxacilline (remplaçant de la méticilline contre *Staphylococcus aureus* (27).

- **Les cyclines**

C'est une famille d'antibiotiques caractérisés par leur action bactériostatique et leur bonne diffusion tissulaire et cellulaire qui leur permet d'agir sur certains micro-organismes à développement intracellulaire. Ils inhibent la synthèse protéique (25).

- **Les aminosides**

Efficaces sur les bactéries à Gram négatif, cette famille n'est utilisable que par injection et engendre de nombreux effets secondaires. Ainsi, ces antibiotiques sont généralement utilisés dans des mélanges avec d'autres, tels que les β -lactamines (28) .

- **Les macrolides**

Cette famille de molécules vient en relai lorsque les pénicillines ne peuvent pas être utilisées. Cependant, ils sont susceptibles d'avoir des interactions avec d'autres médicaments. L'azithromycine, le clarithromycine et le roxithromycine en font partie, par exemple (25).

- **Les quinolones**

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides rapides, concentration-dépendants, à spectre antibactérien large et recommandés dans de nombreuses indications. Ces molécules présentent une très bonne biodisponibilité par voie orale avec une distribution

très large (25). Cependant, du fait de leur importance thérapeutique, les quinolones sont à utiliser raisonnablement afin de prévenir l'émergence de souches résistantes. Les molécules appartenant à cette classe d'antibiotiques sont susceptibles par ailleurs d'entraîner des effets indésirables graves (tendinopathie, troubles neuro-psychiques...) (25).

- **Les autres antibiotiques**

On retrouve différentes molécules comme les sulfamides, les glycopeptides et les polymyxines dont la colistine que nous aborderons plus en détails ultérieurement. La liste de ces antibiotiques est assez floue car certains d'entre eux appartiennent à d'autres familles d'agents tels que les peptides antimicrobiens.

- **Colistine**

La colistine, un antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines, du groupe des polymyxines E, a une activité sélective contre les bâtonnets à Gram négatif. Elle est caractérisée par une bactéricide rapide qui s'accompagne d'un effet post-antibiotique peu marqué, voire inexistant, vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*, prolongé (particulièrement *in vivo*) vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.*

Son mécanisme d'action, non totalement élucidé, est lié à un effet polycationique désorganisant les groupes phosphates des lipopolysaccharides de la membrane des bacilles à Gram négatif. Cette interaction est responsable d'une augmentation de la perméabilité membranaire et d'une fuite du contenu intracellulaire, à l'origine de la mort de la bactérie (29).

II) Antibiorésistance

II-1) Problématiques de l'antibiorésistance

Dès le début de l'utilisation clinique des antibiotiques, des souches bactériennes résistantes à ces molécules sont apparues conduisant au phénomène de l'antibiorésistance, qui est devenu un problème sociétal majeur de santé publique du XXI^{ème} siècle. Selon l'organisation mondiale de la santé, « le monde s'achemine vers une ère post-antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des décennies pourraient à nouveau tuer » déclare le Dr Keiji Fukuda, Sous-Directeur général de l'OMS pour la sécurité sanitaire.

L'antibiorésistance ne connaît ni frontières, ni barrière d'espèces, qu'elles soient bactériennes ou animales. Il s'agit d'un problème extraordinairement complexe, du fait de la diversité des acteurs impliqués, des multiples influences qui s'exercent, y compris dans l'environnement, pour concourir à l'expansion des phénomènes de résistance que nous connaissons (30).

Cependant, l'utilisation massive et répétée d'antibiotiques en santé humaine et animale, principalement dans le secteur de l'élevage porcin, génère au fil du temps une augmentation des résistances bactériennes (26).

II-2) Définition

L'antibiorésistance ou la résistance aux antibiotiques est la capacité d'une bactérie à lutter contre l'action d'un ou de plusieurs antibiotiques. Les humains et les animaux ne deviennent pas résistants aux traitements antibiotiques ; ce sont les bactéries qu'ils portent qui peuvent le devenir.

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place. En outre, il est important de signaler, qu'*in vivo*, la capacité de résistance ou de sensibilité de la souche à la thérapie antimicrobienne mise en place sera dépendante de différents paramètres, tels que la localisation de l'infection, la posologie, le mode d'administration de l'antibiotique, et l'état du système immunitaire de l'individu traité (31).

L'usage excessif et abusif des antibiotiques dans les élevages, les cultures et l'aquaculture contribue à l'antibiorésistance et favorise sa propagation dans l'environnement, dans la chaîne alimentaire et chez l'homme. Cette résistance compromet notre capacité à traiter les maladies infectieuses et remet en cause de nombreuses avancées médicales (32, 33). La **figure 3** présente le scénario idéal de l'administration d'un antibiotique se montrant efficace face à une bactérie.

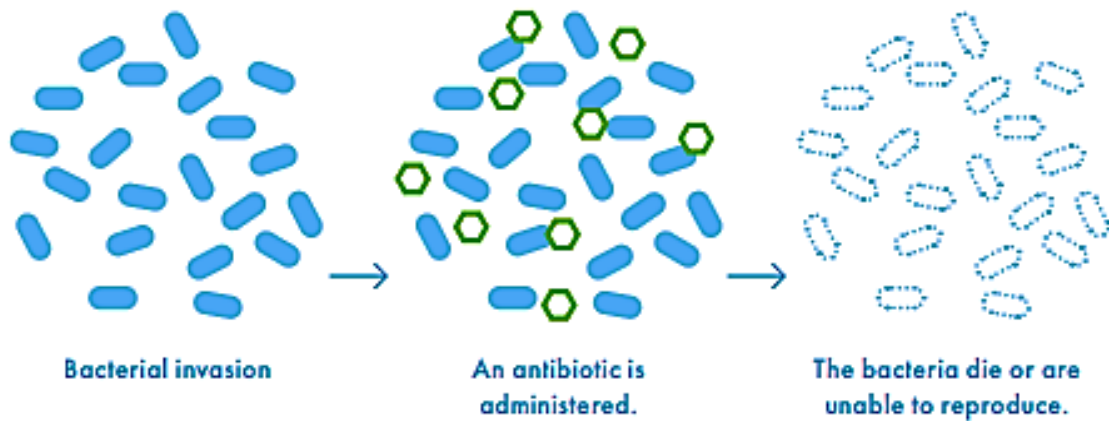


Figure 3 : Action d'un antibiotique sur une bactérie (Source : Annual 2016 - Sandoz) (34).

Au contraire, la **figure 4** présente de façon schématique simple comment une bactérie devient résistante aux antibiotiques (34).

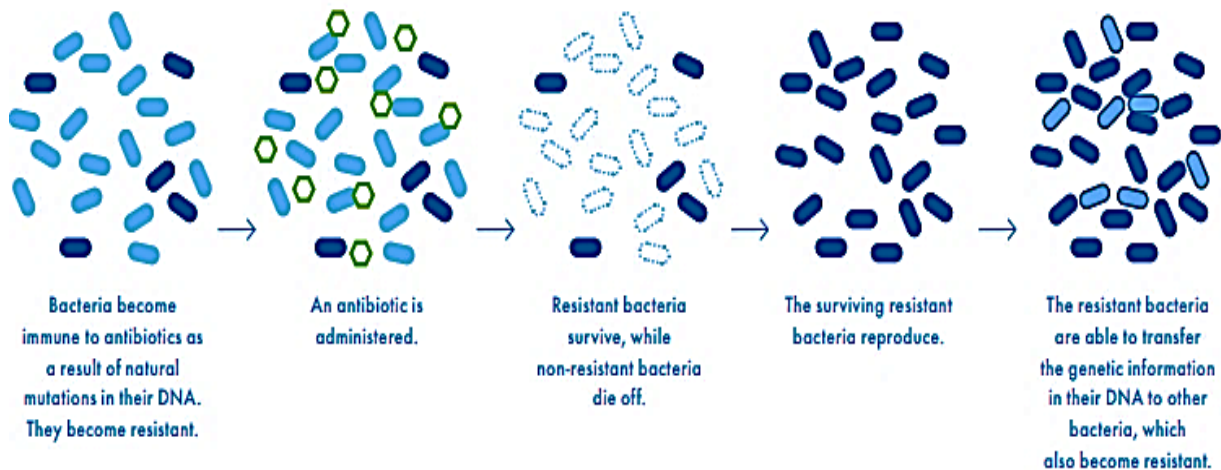


Figure 4 : Une bactérie résistante aux antibiotiques (Source: Annual 2016-Sandoz) (34).

II-3) Mécanismes de résistance

À ce jour, certaines familles d'antibiotiques ne sont déjà plus efficaces contre certaines espèces bactériennes. Ce phénomène de résistance peut être :

- **Naturel**

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. D'un point de vue biologique, cette résistance s'explique simplement par l'absence de la cible de l'antibiotique sur la bactérie, ou bien par l'inaccessibilité de cette cible à l'antibiotique. Cette résistance, propre à une espèce

bactérienne, est portée par le chromosome (35). Elle est transmise à sa descendance, est stable dans le temps, mais ne peut pas se transmettre de manière horizontale, au sein de la même espèce ou entre espèces différentes.

- **Acquis**

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes (36). Ces mécanismes de résistance acquise sont liés à des modifications au niveau de l'ADN (du chromosome) de la bactérie, par des mutations (37) ou par des transferts de gènes résistants d'une bactérie résistante à une bactérie sensible, *via* un plasmide (**Figure 5**) (38).

1. Acquisition par mutation sur des gènes chromosomiques, spontanés ou induites :
 - Mutations spontanées : c'est un changement spontané, rare et héréditaire, qui va affecter la séquence nucléotidique du génome bactérien ;
 - Mutations induites : adaptation d'une bactérie à des conditions défavorables à sa croissance (notamment la présence d'antibiotiques) ;
2. Acquisition de gènes de résistance provenant d'autres souches :
 - Par conjugaison : un gène est transféré d'une bactérie à une autre *via* des plasmides ou des transposons (transfert inter-espèce, souvent à partir de bactéries non pathogènes de l'environnement) ;
 - Par transduction : un gène est transféré d'une bactérie à une autre *via* un bactériophage (transfert intra-espèce) ;
 - Par transformation : transfert d'ADN nu entre deux bactéries (transfert intra- ou inter-espèce).

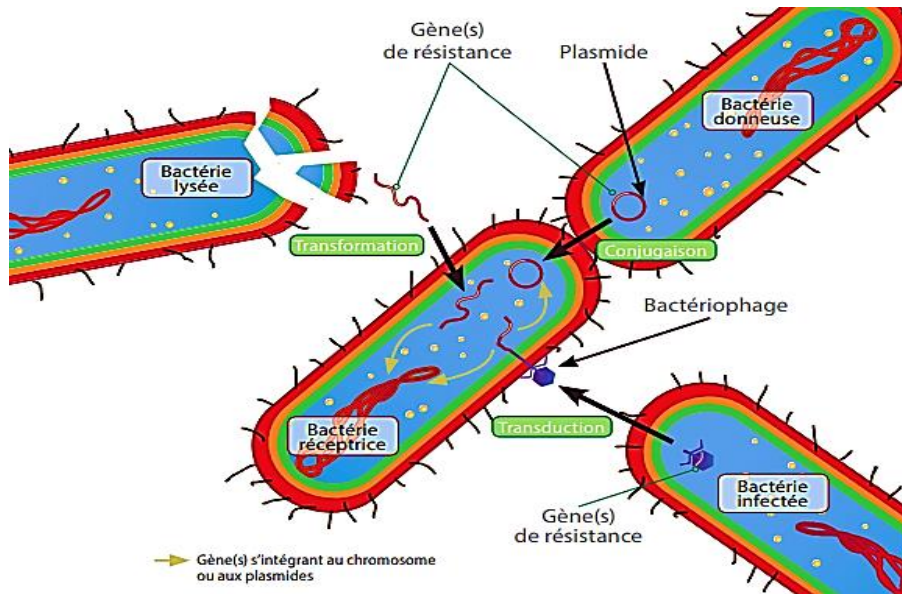


Figure 5 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries Source Levy et al. (2004) (39).

Une fois la résistance apparue, la pression de sélection des antibiotiques va ensuite jouer un rôle essentiel puisqu'elle va permettre la sélection des souches résistantes. En effet, au sein d'une flore bactérienne essentiellement sensible à un antibiotique administré (flore intestinale notamment), cet antibiotique va avoir une action inhibitrice sur les bactéries sensibles de la flore commensale, entraînant leur disparition transitoire, et laissant alors de la place aux souches ayant acquis le gène de résistance, permettant ainsi leur croissance (**Figure 6**) (40).

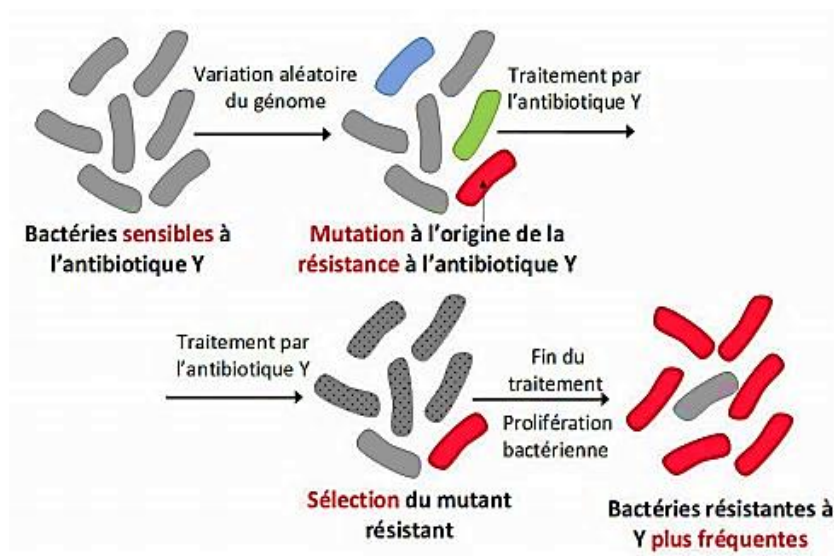


Figure 6 : Pression de sélection des antibiotiques (40).

II-4) Les différents mécanismes de la résistance bactérienne

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances (**Figure 7**).

- Modification de la membrane : ce mécanisme permet de réduire la consommation de la molécule active par la bactérie en modifiant le récepteur cellulaire bactérien (comme pour la polymyxine B ou en changeant le protéome membranaire).
- Production d'enzymes inactivant le produit actif : certaines enzymes sont produites afin de cliver (par exemple les β -lactamases et metallo- β -lactamases MBL) ou afin de modifier la molécule active (phosphotransférases ou adényltransférases des aminoglycosides). Les gènes codant ces enzymes sont souvent d'origine plasmidique.
- Diminution de la concentration intracellulaire par des pompes intra-membranaires : ce mécanisme est très courant chez les souches résistantes à de nombreuses substances actives (MDR, Multi-Drug Resistant) car il permet d'expulser ces molécules en dehors de la bactérie. Les genres *Staphylococcus*, *Escherichia* et *Pseudomonas* utilisent ce mécanisme.
- Réduction de la perméabilité bactérienne : Afin de se défendre contre des antibiotiques ayant une activité intracytoplasmique, certaines bactériennes réduisent leur perméabilité en limitant leur nombre de porines ou de transports.

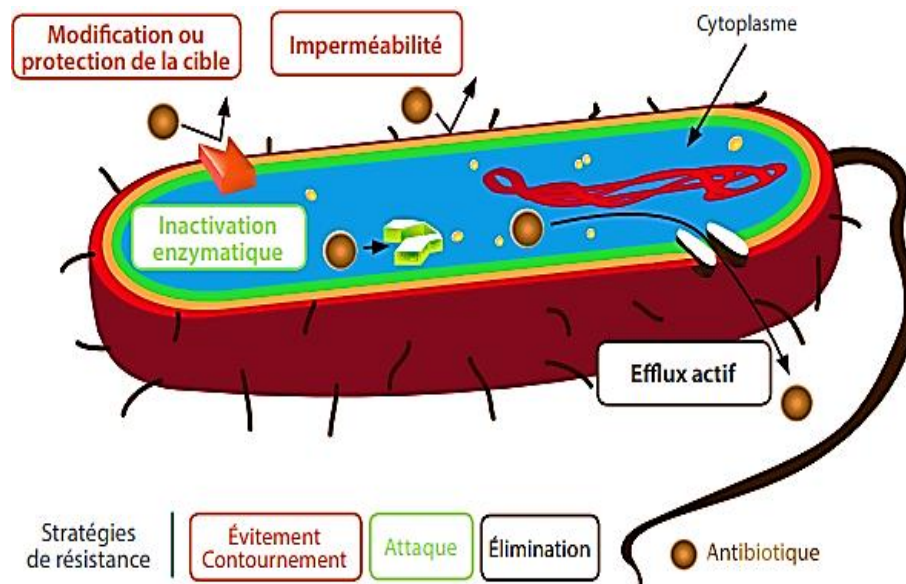


Figure 7 : Les différents mécanismes de la résistance bactérienne (source : Mérens et al.2010 (41).

II-5) Facteurs causal de l'antibiorésistance

Toute exposition aux antibiotiques produit l'émergence de résistances, y compris les traitements efficaces sur le plan clinique. Mais le phénomène de la résistance est amplifié notamment par le mésusage des antibiotiques et par la consommation importante d'antibiotiques.

II-5-1) Mésusage des antibiotiques

Au terme de l'article .R. 5121-152, 4° du Code de la Santé Publique, le mésusage est défini comme « une utilisation intentionnelle et inappropriée d'un médicament ou d'un produit en rapport avec la dose autorisée ou prescrite, la voie d'administration, les indications, ou non conforme aux termes de l'autorisation de mise sur le marché ou de l'enregistrement ainsi qu'aux recommandations de bonnes pratiques » ([42](#)).

Le mésusage des antibiotiques est l'un des facteurs déterminants de résistances aux antibiotiques. Il peut se caractériser par :

- Une prescription inutile d'antibiotiques, comme par exemple en cas d'infections virales de type angine virale insensibles aux antibiotiques
- Un retard d'administration d'antibiotiques pour des patients ayant une infection sévère ;
- Une utilisation incorrecte des antibiotiques à spectre étroit et excessive des antibiotiques à large spectre ;
- Une utilisation de doses inférieures ou supérieures à la posologie recommandée ;
- Une utilisation d'antibiotiques sur une durée trop courte ou trop longue
- Un traitement antibiotique non adapté aux résultats microbiologiques et à l'évolution clinique ;
- Une non-réévaluation du traitement antibiotique après 24/72 heures, pourtant nécessaire pour vérifier l'efficacité du traitement antibiotique administré.

II-5-2) Surconsommation des antibiotiques

Le centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) publie chaque année un rapport mis à jour, portant sur les données de consommation d'antibiotiques collectées au sein des pays de l'Union Européenne (UE). Le dernier rapport datant de Novembre 2017, expose les données de 2016 ([43](#)).

• **Consommation des antibiotiques au sein de l'Union Européenne**

En 2016, la consommation moyenne d'antibiotiques prescrits en médecine de ville au sein des pays de l'UE était de 21,9 DDD (doses journalières définies) /1000 habitants /jour en ville. Avec 30,3 DDD/1000 habitants/jour, la France restait donc très au-dessus de la moyenne européenne et se situait au 3^{ème} rang des pays les plus consommateurs, derrière la Grèce (36,3 DDD/1000 habitants/ jour) et Chypre (33,0 DDD/1000 habitants/ jour). Ces trois pays sont également ceux au sein desquels l'utilisation d'antibiotiques hors prescription était la plus importante en 2013 comme en 2016. La France, en revanche, fait partie des pays au sein desquels l'utilisation d'antibiotiques hors prescription médicale est la plus faible (4 %) selon l'Agence National de la Sécurité des Médicaments et des produits de santé (ANSM) (44) (cf. **Tableau 1**).

Tableau 1. Consommation d'antibiotiques en ville dans un panel représentatif de pays selon ANSM 2017 (44).

Pays	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2012	2014	2015	2016
Allemagne	13.6	12.7	13.0	13.6	14.5	14.9	14.9	14.6	14.3	14.1
Belgique	25.3	23.8	22.7	24.2	27.7	28.4	29.8	28.4	29.3	27.5
Bulgarie	20.2	17.3	16.4	18.1	20.6	18.2	18.5	21.2	21.4	19.8
Chypre	n.d	n.d	n.d	31.9	33.7	31	29.7	26.1	31.1	33.0
Espagne	19.0	18.0	18.5	18.7	19.7	20.3	20.9	21.6	22.2	23.0
France	33.4	32.0	27.1	27.9	28.0	28.2	29.7	29.0	29.9	30.3
Grèce	31.7	32.8	33.0	41.1	45.2	39.4	31.9	34.0	36.1	36.3
Italie	24.0	24.3	24.8	26.7	28.5	27.4	27.6	27.8	27.5	26.9
Pays-Bas	9.8	9.8	9.7	10.8	11.2	11.2	11.3	10.6	10.7	10.4
Pologne	22.6	21.4	19.1	n.d	20.7	21	19.8	22.8	26.2	24.0
Royaume-Uni	14.3	14.8	14.8	15.0	15.3	17.0	18.6	20.1	20.9	19.6
Suède	15.5	15.2	14.5	15.3	14.6	14.2	14.1	13.0	12.3	12.0

*Légende. N.d : non déterminé.

En 2016, la consommation moyenne d'antibiotiques en milieu hospitalier au sein de 21 pays de l'UE participants était de 2,06 DDD/1 000 habitants/jour à l'hôpital, et la France se situait

au huitième rang des pays les plus consommateurs avec une consommation de 2,19 DDD/1000 habitants/jour. Dans ce secteur, la consommation d'antibiotiques en France est plus proche de la moyenne européenne que dans le secteur ambulatoire (cf. **Tableau 2**).

Tableau 2: Consommation d'antibiotiques à l'hôpital dans un panel représentatif de pays (44, 45).

Pays	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2012	2014	2015	2016
Belgique	2.2	2.2	2.1	1.9	1.7	2.0	1.7	1.6	1.7	1.6
Danemark	1.4	1.5	1.6	1.7	1.7	1.8	1.8	2.1	2.3	2.0
Finlande	3.8	3.9	3.4	3.5	3.3	2.8	2.8	2.6	2.5	2.5
France	2.8	2.7	2.3	2.2	2.2	2.2	2.1	2.2	2.2	2.2
Grèce	2.3	2.2					2.1	2.1	2.1	2.4
Italie					2.3	2.1	2.5	2.2	2.4	2.5
Lettonie		6.2	4.7	3.2	3.0	3.0	3.1	2.2	2.2	2.1
Luxembourg	2.2	2.4	2.0	2.1	2.2	2.1	2.0	1.8	1.8	1.7
Pays-Bas	0.6	0.7				1.1	1.0	0.9	1.0	1.0
Portugal						1.4	1.5	1.5	1.6	1.6
Suède	1.3	1.3	1.3	1.5	1.5	1.5	1.7	1.6	1.7	1.7

- **Consommation des antibiotiques en France**

En France, en 2016, 786 tonnes d'antibiotiques ont été vendues. 90% des antibiotiques vendus étaient consommés en médecine de ville et 10% en établissements de santé, selon le rapport de la consommation des antibiotiques en France en 2016 - ANSM: [Cité 22 novembre. 2018] (44). En médecine de ville, la consommation globale d'antibiotiques s'élevait à 30,3 doses pour 1 000 habitants et par jour. Elle était notamment de 27,9 doses pour 1 000 habitants et par jour en 2006. En 10 ans, la consommation d'antibiotiques en ville a donc sensiblement augmenté (**Figure 8**).

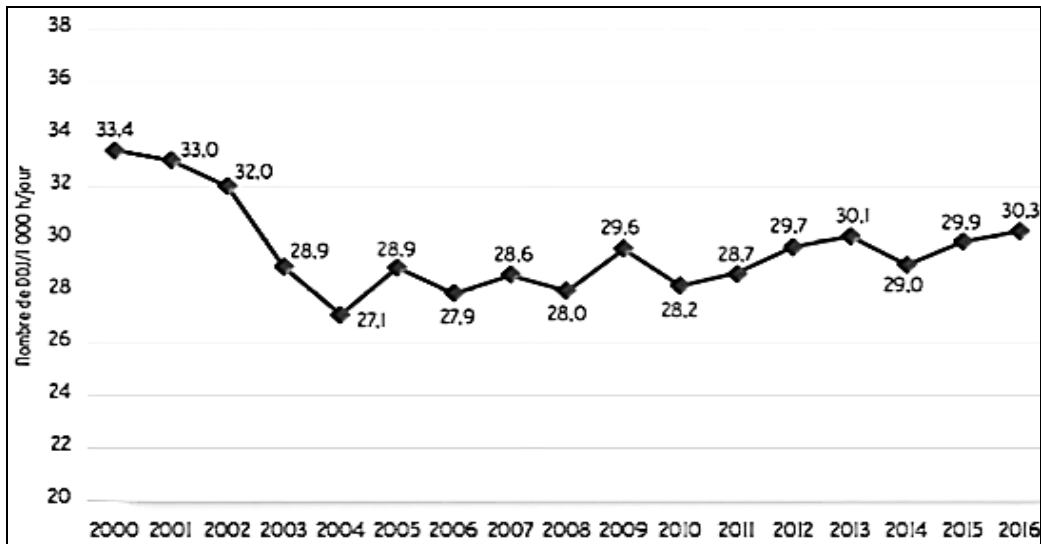


Figure 8 : Evolution de la consommation d'antibiotiques en ville mesuré en nombre de doses journalières définies (DDJ) pour 1000habitants/jour entre 2000 et 2016 (Source ANSM) (44).

Selon les données de l'ANSM, la consommation en milieu hospitalier s'est établie à 2,19 DDJ/1 000 h/jour en 2016. Les β -lactamines, pénicillines (seules ou associées) représentaient la part la plus importante de la consommation hospitalière totale en antibiotiques, avec un taux de 58,0 %.

II-6) Conséquences de l'antibiorésistance

Une augmentation des dépenses médicales, une prolongation des hospitalisations et une hausse de la mortalité sont les principales conséquences de l'antibiorésistance (46). A l'heure actuelle, l'antibiorésistance est la troisième cause de mortalité dans le monde d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elle pourrait devenir la première cause de mortalité dans le monde. Celle-ci remettra en question la capacité à soigner les infections, y compris les infections les plus bénignes. Dans le monde, 700 000 personnes meurent chaque année d'infections dues à une bactérie multiresistante (BMR), dont 25 000 en Europe. D'ici 2050, 10 millions de personnes mourront de celles-ci si rien n'est fait (Figure 9).

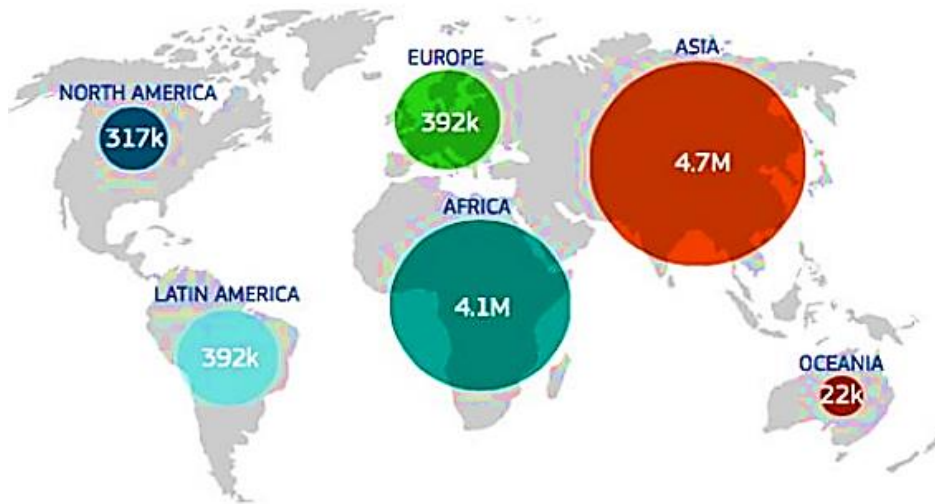


Figure 9 : Nombre de décès /an en 2050 dans le monde causé par les bactéries multirésistantes (Source : commission européenne (46)).

III) Bactéries multirésistantes (BMR)

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques lorsqu'elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique (47). De ce fait, la multirésistance 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 mondiale selon l'OMS. Les études nationales de prévalence menées par le Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) en 2001, 2006 et 2012 ont montré que les BMR étaient responsables d'une part non négligeable des infections nosocomiales (IN) en France. De plus, trois micro-organismes représentent à eux seuls plus de la moitié (53,5%) des germes isolés des IN. Il s'agit d'*E. coli*, de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*. (48). Ces pathogènes multirésistants ont récemment été surnommés les pathogènes « ESKAPE » (*Ent. facium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Enterobacter spp*) reflétant leur capacité à « échapper » aux agents antibactériens. En effet, la résistance aux carbapénèmes des Enterobacteriaceae, mais également des souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (conférée par la production de carbapénémases, notamment de type NDM (New Delhi Metallo-β-Lactamase)) est un problème émergent. En effet, depuis 2009, l'émergence et la dissémination d'isolats porteurs d'un gène plasmidique NDM ont été rapportés sur tous les continents, excepté l'Antarctique (49).

III-1) Bactéries à Gram-positif multirésistantes

III-1-1) *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

S. aureus, appelé également staphylocoque doré à coagulase positive, est une bactérie à Gram-positif qui colonise fréquemment la peau de l'homme en bonne santé. Cependant, *S. aureus* est aussi un microorganisme opportuniste impliqué dans des infections d'origine communautaire ou suite à des soins de santé. En plus d'être une cause commune des infections de la peau, des tissus mous et des os, il est l'un des principaux pathogènes impliqués dans les infections nosocomiales.

S. aureus présente deux mécanismes distincts de résistance aux antibiotiques (50, 51). Le premier mécanisme de résistance du staphylocoque doré à la pénicilline date de 1942, soit peu de temps après la première utilisation de cet antibiotique (50). En effet, grâce à l'acquisition du gène *blaZ* plasmidique, *S. aureus* est devenue capable de produire une β -lactamase de classe A (pénicillinase) avec une très grande fréquence (90% des souches) (51). Pour pallier l'augmentation des résistances à cette époque, une pénicilline semi-synthétique résistante à cette pénicillinase a été commercialisée en 1960, il s'agit de la méticilline (pénicilline du groupe M). Mais en 1961, les premières souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont observées (51).

Le deuxième mécanisme de résistance correspond à une modification de la cible, les protéines liant les pénicillines (PLP). Les SARM synthétisent une nouvelle PLP, la PLP2a, ayant une faible affinité pour la méticilline (ainsi que pour toutes les β -lactamines). La synthèse de la paroi bactérienne peut alors continuer, même si les autres PLP sont inactivées. La PLP2a est codée par le gène *mecA*, faisant partie d'un élément génétique mobile chromosomique nommé cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), et pouvant se transmettre horizontalement (50, 51). Cependant, le nombre total d'isolats de *S. aureus* invasifs testés (N) et le pourcentage de résistances à la méticilline (SARM) en Europe ont diminué de 18.1% en 2013 à 13.7% en 2016 (52).

III-1-2) *Streptococcus pneumoniae* résistant aux pénicillines

S. pneumoniae est un cocci à Gram-positif, pouvant être à l'origine de plusieurs pathologies ORL (pneumonies, otites, sinusites aiguës) et de méningites. On observe des

résistances aux pénicillines chez cette bactérie et c'est notamment lié à l'acquisition de mutation sur le gène responsable de la synthèse des PLP. En effet, plus le gène codant pour les PLP sera muté, plus la concentration minimale inhibitrice (CMI) des pénicillines sera augmentée, ce qui rend les pénicillines inutilisables (puisque les PLP sont leur cible d'action) (52).

Un autre type de résistance est caractérisé, celui de la résistance aux macrolides qui peut être liée à la présence de protéine d'efflux (gène *mefE*) qui va rejeter l'antibiotique en dehors de la bactérie, ou à l'acquisition d'une méthylase d'origine plasmidique qui en déméthylant le ribosome diminue l'affinité de celui-ci pour l'antibiotique (gène *ermB*)(53).

III-1-3) *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*

Les espèces du genre *Enterococcus* sont des bactéries « cocci » à Gram positif en chaînettes, aéro-anaérobies. Leur réservoir est humain (flore digestive et flore génitale féminine) et environnemental grâce à leur capacité à survivre dans des conditions diverses (54). Deux espèces sont retrouvées en pathologie infectieuse humaine : *Ent. faecalis* (la plus fréquente) et *Ent. faecium*. Les entérocoques peuvent provoquer diverses infections, notamment des infections des voies urinaires, des infections du sang et des endocardites, et sont associés à une péritonite et à des abcès intra-abdominaux (52).

Les entérocoques sont naturellement résistants aux céphalosporines et la majorité des souches d'*Ent. faecalis* sont sensibles à l'ampicilline (55). Les premières souches d'*Ent. faecium* présentant un haut niveau de résistance aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) ont été rapportées en France en 1987. Des gènes de résistance (*vanA* à *vanB*) permettent à la bactérie de synthétiser des précurseurs modifiés du peptidoglycane, cible d'action des glycopeptides, entraînant une diminution de l'affinité des antibiotiques. Le gène *vanA* est le plus fréquent et confère une résistance de haut niveau aux glycopeptides. Ce gène est localisé sur un transposon rendant son transfert possible à d'autres bactéries. Les autres gènes sont beaucoup plus rares (56).

III-2) Bactéries à Gram-négatif multirésistantes

III-2-1) *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii est une bactérie « coccobacille » à Gram-négatif aérobie strict, responsable de pneumonies, de bactériémies, d'infections urinaires et de méningites nosocomiales (54). A.

baumannii est considéré comme multirésistant lorsqu'il présente une résistance à au moins deux classes d'antibiotiques sur les cinq classes suivantes: céphalosporines, carbapénèmes, ampicilline, fluoroquinolones et aminoglycosides (57).

III-2-2) *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif aérobie stricte, ubiquitaire, saprophyte et naturellement résistante aux antibiotiques, qui peut devenir un pathogène opportuniste, responsable dans des conditions favorables des infections nosocomiales (IN). Ce bacille à Gram négatif ubiquitaire est responsable de 10% à 15% de l'ensemble des infections nosocomiales (58). L'augmentation de la multirésistance chez *P. aeruginosa* est progressive dans le monde entier. La définition variable de cette multirésistance inclut généralement la résistance aux fluoroquinolones, aux carbapénèmes et aux aminosides (59, 60).

III-2-3) Les entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif. Ils sont fréquemment impliqués dans des infections communautaires et nosocomiales. Ils sont généralement traités par les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines à large spectre et carbapénèmes) ou encore par les fluoroquinolones. Depuis environ 20 ans, on observe une augmentation des résistances chez les entérobactéries à ces antibiotiques. Les entérobactéries peuvent être naturellement résistantes ou acquérir cette résistance par mutation chromosomique ou par acquisition de matériel génétique sous forme de plasmide (les *E. coli* productrices de BLSE) ce qui est le cas le plus fréquent.

- ***Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)**

K. pneumoniae est une bactérie à Gram négatif commune, de distribution mondiale, provoquant principalement des pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent 50%). Elle est également responsable de 9% des infections nosocomiales du tractus urinaire (61). *K. pneumoniae* possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines (amino-, carboxy- et uréido- pénicillines), Cet gène de résistance (SHV-1) lui permet de fabriquer une β -lactamase la rendant résistante aux pénicillines (62), ainsi que pour divers gènes conférant une résistance aux médicaments autres que les β -lactames. De même, cette bactérie est résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et aux carbapénèmes (63).

- *Salmonella*

Salmonella est l'une des causes les plus fréquentes de maladies bactériennes d'origine alimentaire avec des dizaines de millions de cas humains dans le monde chaque année. Dans l'Union Européenne, les salmonelles sont responsables de la seconde maladie zoonotique en nombre chez l'homme. La majorité des infections sont causées par les sérovars Enteritidis et Typhimurium. En France, *Salmonella* constitue la première cause de toxi-infections d'origine alimentaire, se traduisant par une diarrhée fébrile 12 à 24 h après la contamination (64).

Les mécanismes de résistance aux β -lactamines chez *Salmonella*, et notamment aux C3G/4G, sont identiques à ceux identifiés chez *E. coli* et incluent la production de BLSE et de céphalosporinases (63).

- *Escherichia coli* (*E. coli*)

La bactérie *E. coli* fut isolée pour la première fois de la flore intestinale de nourrissons, par le pédiatre et microbiologiste allemand Theodor Escherich en 1885. Le nom de ce micro-organisme a été donné en l'honneur de ce dernier. Depuis, elle est devenue l'une des bactéries les plus étudiées et les mieux caractérisées par les laboratoires de bactériologie (65). *E. coli* est une BGN, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, anaérobie facultatif, de taille variable, en fonction des conditions de croissance, en forme de bâtonnet, possédant des flagelles péritriches et pouvant fermenter le lactose. Cette caractéristique lui confère une morphologie de large colonie rose sur gélose MacConkey. Les autres propriétés biochimiques qui peuvent permettre de la différencier sont la production d'indole en présence de tryptophane, l'absence d'uréase et de production de H₂S et l'incapacité à utiliser le citrate comme seule source de carbone (66). *E. coli* constituent l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin (67) et font partie de la microflore bactérienne « commensale » du tractus digestif de l'Homme ainsi que de celle de la plupart des animaux à sang chaud (68). Néanmoins, certaines souches d'*E. coli* ont été répertoriées comme pathogènes pour l'Homme car responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques parfois mortelles (mortalité de 16% au 30^{ème} jour) en médecine humaine (69).

En médecine vétérinaire, *E. coli* est principalement responsable d'infections intestinales, de septicémies chez les jeunes animaux (chien et porc) et les volailles, de mammites cliniques chez la vache laitière. D'autres peuvent accidentellement coloniser un site en dehors du tractus

intestinal et y causer des maladies, par exemple des infections du tractus urinaire (ITU) (65, 66). Les bactéries *E. coli* possèdent la capacité de se transmettre des gènes entre elles. Elles peuvent également obtenir de nouveaux gènes *via* des plasmides ou des phages. Les souches d'*E. coli* pathogènes se distinguent des souches commensales, notamment par la grandeur de leur génome. Elles possèdent des portions d'ADN dits « îlots de pathogénités » (IPAS), qui leur confèrent des facteurs de virulence. Chez l'animal, il est possible de distinguer trois types d'infections distinctes reliées à des pathotypes : les infections entériques, les infections urinaires et les septicémies/méningites, associées aux symptômes causés et à l'interaction avec les cellules de l'hôte. Ces facteurs permettent de les classer en différents pathotypes et de les identifier (69-71). Il y a sept catégories de pathotypes : les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* producteurs de Shiga toxine (STEC), les *E. coli* Entéropathogéniques (EPEC), les *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* Entéroaggrégatives (EAEC), les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC) et les *E. coli* diffus adhérents (DAEC). Il existe également des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) qui incluent les *E. coli* uropathogènes (UPEC) lesquels sont associés aux infections du système urinaire, les *E. coli* (MNEC) qui causent des méningites et des septicémies et les *E. coli* pathogènes des espèces aviaires (APEC) responsables d'infections respiratoires, de péricardites et de septicémies chez la volaille (66, 72, 73).

Les *E. coli* pathogènes des porcs appartiennent aux ETEC et EAEC. Les ETEC entraînent des diarrhées néonatales et DPS (Diarrhée Post-Sevrage).

- Les *E. coli* ETEC sont la cause la plus commune de diarrhée chez les animaux. Ils sont caractérisés par la production d'adhésines leur permettant d'adhérer à la cellule épithéliale et par les 10 productions d'entérotoxines. Les *E. coli* entérotoxigènes sont la principale cause de diarrhée néonatale et diarrhée post-sevrage chez le porcelet (74). Les ETEC sont définies comme des souches produisant au moins une des toxines des deux familles d'entérotoxines : les toxines thermolabiles (LT) et les toxines thermostables (ST).
- L'*E. coli* EAEC est un agent pathogène émergent responsable de maladies infectieuses d'origine alimentaire et entérique. La pathogénèse d'*E. coli* EAEC implique trois étapes: 1) adhésion à la muqueuse intestinale, 2) augmentation de la production et du dépôt d'un biofilm de mucus, et 3) toxicité muqueuse due à l'inflammation et à la libération de cytokines (75).

III-2-4) Emergence de souche *E. coli* multirésistantes

Les animaux sont potentiellement le réservoir de nombreuses zoonoses, incluant celles causées par les *E. coli* productrices de BLSE, pouvant être transmises à l'homme par contact direct ou *via* la chaîne alimentaire (64).

En 2017, en France, le Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (RESAPATH) indique que le taux de résistance le plus élevé aux céphalosporines de troisième et quatrième générations (C3G et C4G) dans les infections animales se situe autour de 6 % et se retrouve chez les équidés (6.2%) et les chiens (5.8). Elle est autour de 4% chez le chat (4.1%) et les bovins (3.6%). Dans les autres espèces, il est égal ou inférieur à 2% (poules et poulets, porcs et dindes) (76). De plus, la prévalence chez des animaux sains est élevée : elle est estimée, en France, entre 2005 et 2006 à 5,8% (dont 4,1% de BLSE) dans des prélèvements fécaux chez les bovins.

Concernant la résistance chez *E. coli* aux fluoroquinolones, les données 2017 montrent que la filière bovine reste celle présentant la proportion de résistance aux fluoroquinolones la plus élevée (11,2 %), mais avec une forte décroissance cette année, et de façon générale depuis 2010. Cette diminution du niveau de la résistance concerne également les chiens (22 % en 2010 à 7,5 % en 2017) et les porcs (autour de 10 % depuis 2012 vs 4,3 % en 2017). Les équidés (4,3 %) et les dindes (2,9 %) affichent également des niveaux de résistance encore inférieurs cette année (**Figure 10**).

Ces résultats restent positifs dans leur ensemble mais doivent néanmoins faire l'objet d'une attention particulière. En effet, les proportions de résistance aux fluoroquinolones restent toujours globalement supérieures à celles aux C3G/C4G, quelles que soient les espèces animales (76).

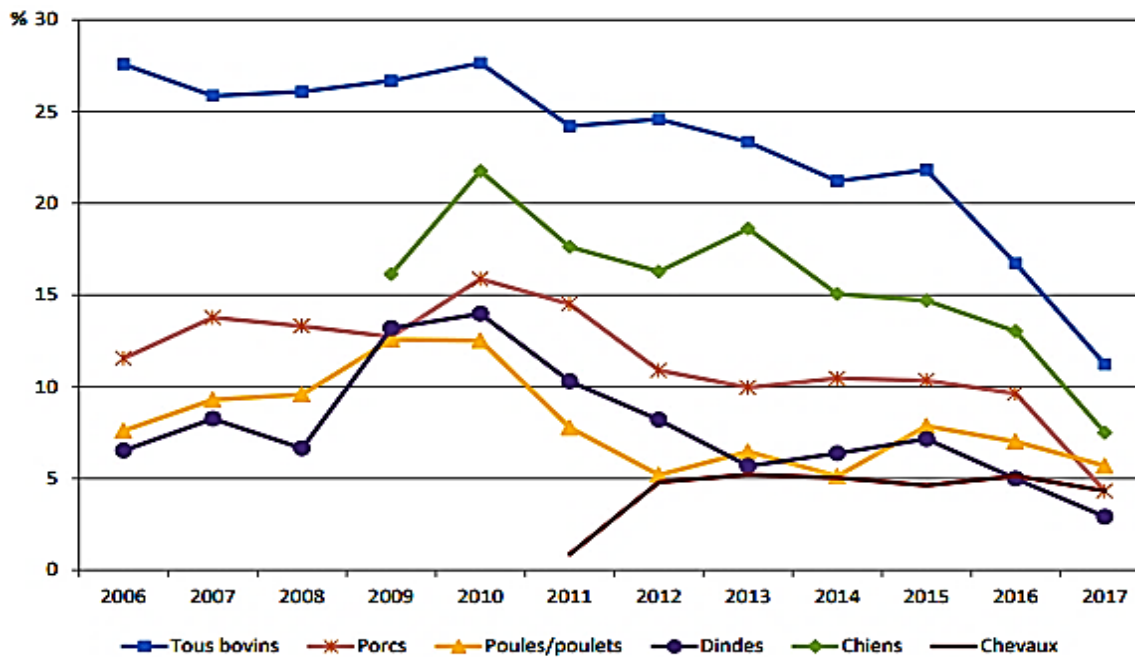


Figure 10 : Evolution des proportions de souches d’E. coli non sensibles (I+R) à l’enrofloxacin ou à la marbofloxacin chez les bovins, porcs, volailles, chiens et chevaux (2006-2017) (76).

III-2-5) La diarrhée post-sevrage (DPS)

- **Généralités**

La diarrhée post-sevrage due à *Escherichia coli* est une maladie économiquement importante dans la production porcine du monde. Elle affecte les porcs au cours des deux premières semaines après le sevrage et se caractérise par une mort subite ou une diarrhée, une déshydratation et un retard de croissance chez les porcelets survivants (77). En outre, de nombreux facteurs de stress associés à la période de sevrage, tels que le retrait de la truie, des changements alimentaires, l'adaptation à un nouvel environnement, le mélange de porcs de différentes exploitations et des changements histologiques dans l'intestin grêle, peuvent affecter négativement la réponse du système immunitaire et conduire à un dysfonctionnement de l'intestin (78) chez les porcs puisque la capacité d'absorption des fluides de l'intestin grêle va en diminuant progressivement alors que cette absorption augmente dans le gros intestin (76). Ces modifications engendrent une perte de poids considérable (79) et une dégradation de la santé des porcelets qui se traduit par une faible croissance des porcelets en post-sevrage et des mortalités à des taux importants pouvant aller jusqu'à 20% (80, 81). La diarrhée post-

sevrage est généralement associée à la prolifération d'*E. coli* entérotoxigènes (ETEC) et de la maladie d'œdème (82).

- **Facteurs de risque de diarrhée post-sevrage chez le porc**

La diarrhée post-sevrage est une maladie entérique économiquement importante chez les porcs en raison de pertes financières (83). Cette maladie survient le plus souvent dans les deux semaines suivant le sevrage et se caractérise par une diarrhée abondante, une déshydratation, une mortalité significative et une perte de poids corporel des porcs survivants (77). La mortalité associée à cette maladie peut atteindre 20 à 30% sur une période de 1 à 2 mois chez les porcs sevrés (83). La DPS est une maladie multifactorielle dont la cause exacte n'a pas encore été identifiée (84) (**Figure 11**).

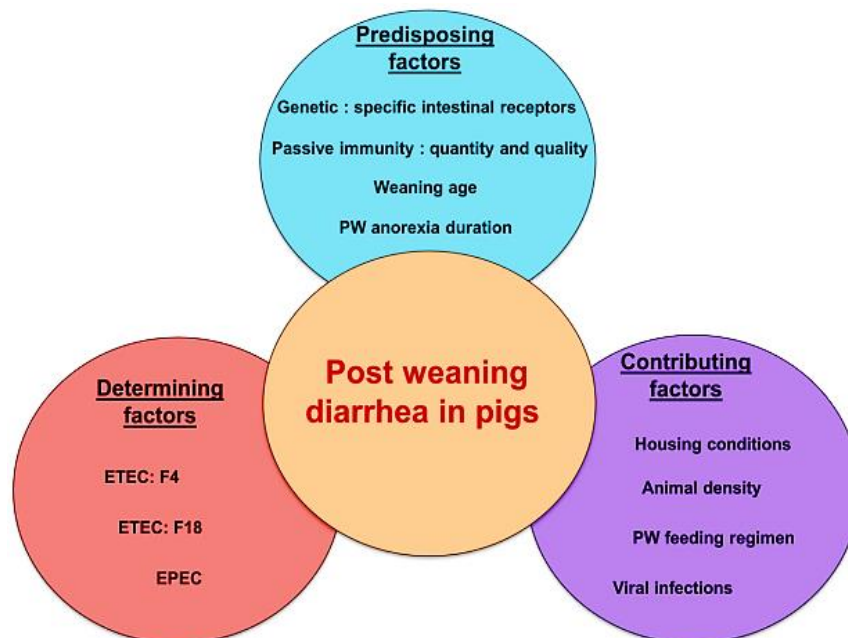


Figure 11 : La genèse multifactorielle de la diarrhée post-sevrage chez les porcs implique une interaction entre des facteurs prédisposants, contributeurs et déterminants (84).

- **Facteurs prédisposants**

La diarrhée post-sevrage (DPS) est généralement associée à la prolifération d'une ou plusieurs souches d'ETEC β -hémolytique dans l'intestin grêle du porc, en particulier celles exprimant les adhésines fimbriales F4(K88) ou F18 (77). Des perturbations morphologiques de la muqueuse intestinale favorisent la création d'un environnement idéal pour la multiplication d'*E. coli* et permet aux toxines et aux bactéries de traverser l'épithélium à la suite de cette inflammation (**Figure 12**). Ainsi l'adhésion des cellules épithéliales de l'intestin

grêle et la colonisation ultérieure par ETEC sont médiées par les récepteurs spécifiques F4 ou F18 (F4R ou F18R), dont l'existence et la fonction sont cruciales pour déterminer la susceptibilité des porcs à l'infection par ETEC (77, 85). La période post-sevrage est une phase critique de la vie du porc, lorsque le système immunitaire intestinal est immature, et que l'élimination du lait de truie, ainsi que l'interruption consécutive de l'apport nutritionnel en IgA (Immunoglobulines A) présent dans ce lait contribuent à accroître la sensibilité des porcs aux infections microbiennes(86).

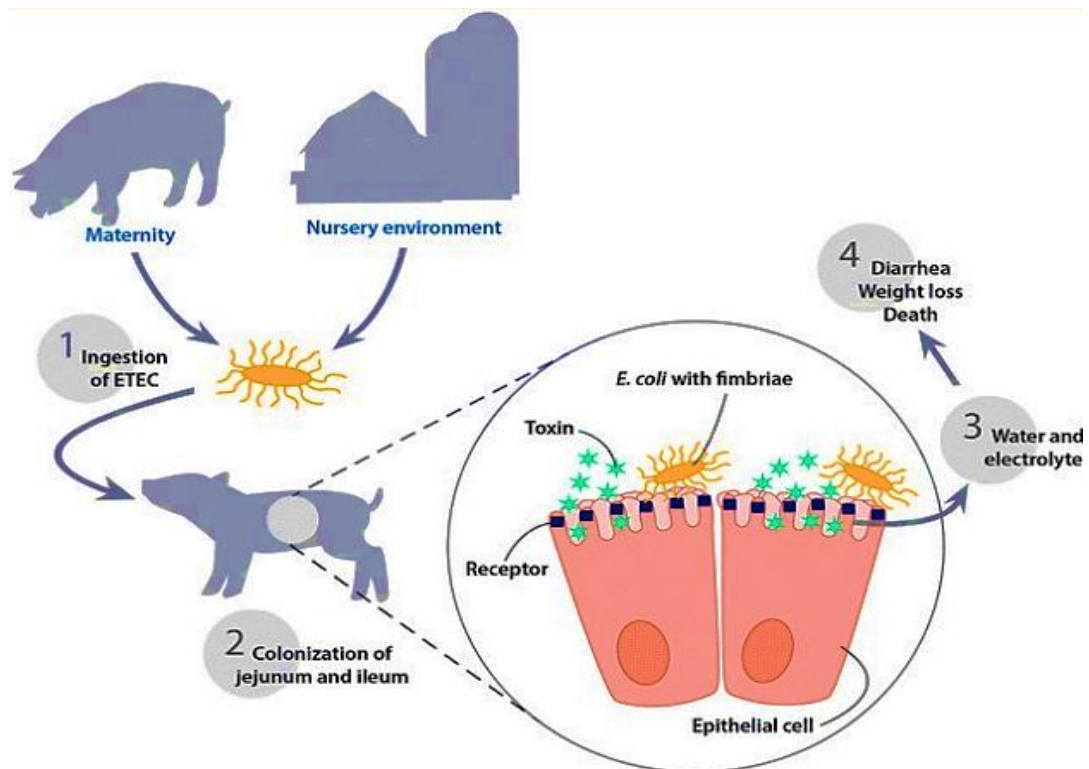


Figure 12 : Représentation schématique des étapes impliquées dans la pathogenèse de la diarrhée post-sevrage chez le porc (84).

Selon une étude réalisée par le laboratoire Elanco entre 2014 et 2016, dans sept élevages sur dix confrontés à des problèmes de diarrhées de post-sevrage, les souches d'*E. coli* F4 et/ou F18 représentent plus de 10%. C'est ce que révèle le bilan réalisé par le laboratoire Elanco, de 2014 à 2016, auprès de 900 élevages ayant fourni des écouvillons rectaux de porcelets présentant cette diarrhée qui survient quatre à cinq jours après le sevrage ou à la transition entre premier et deuxième âges. Plus en détail, la souche F4 est retrouvée seule dans 34% des cas, la souche F18 seule dans 24% des cas, et l'association des deux dans 10% des cas (Figure 13) (87).

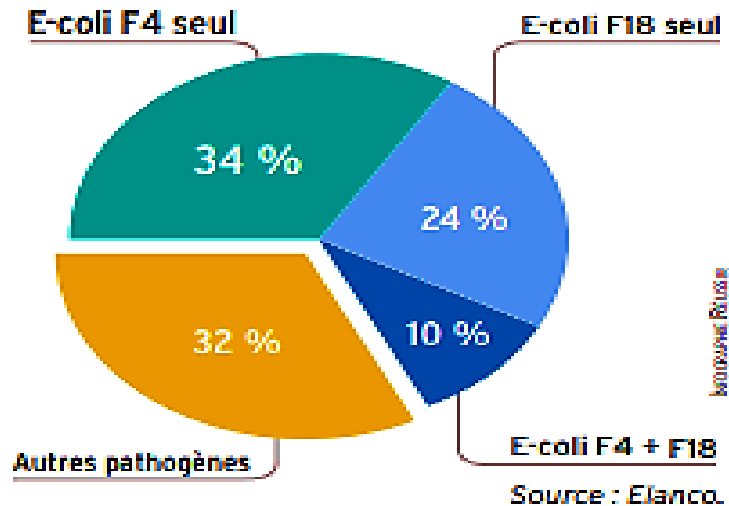


Figure 13 : Résultats des Epidemiocolis.

- **Facteurs contributifs**

Les facteurs liés au logement, la densité de population, la production séparée par parité et le régime alimentaire après le sevrage jouent un rôle dans le développement des personnes handicapées (88).

- **Facteurs déterminants**

EPEC est la cause la plus courante de DPS chez le porc. Ce pathotype est caractérisé par la production d'entérotoxines et d'adhésines, toutes deux essentielles au développement de la maladie. Les entérotoxines produites par EPEC peuvent être thermostables ou thermolabiles. Les gènes d'entérotoxines se trouvent sur les plasmides de bactéries EPEC et agissent sur l'épithélium intestinal de porc (77). L'infection par EPEC entraîne la maladie de l'œdème, caractérisée par des symptômes cliniques graves allant de changement surprenant dans la vocalisation jusqu'à la mort au bout de 1 à 3 jours.

Normalement ces signes cliniques commençaient à 7-14 jours après le sevrage et semblaient affecter en particulier les porcs plus grands et les mieux développés. Les symptômes nerveux étaient de l'ataxie (incoordination et mouvements maladroits), de la prostration et des convulsions. En plus des signes nerveux, beaucoup de porcs malades avaient un gonflement marqué (œdème) du tissu mou des paupières supérieures et inférieures. Occasionnellement, les porcs atteints avaient aussi un changement surprenant dans la vocalisation depuis les cris perçants normaux à d'autres très aigus (89).

- **Utilisation de la colistine chez les porcs sevrés**

En 1960, la colistine est utilisée pour la première fois dans la production porcine dans de nombreux pays pour le traitement et la prévention des troubles digestifs causés par les entérobactéries et même parfois pour la promotion de la croissance sur de longues périodes afin d'améliorer le taux de croissance et l'efficacité de la conversion alimentaire chez les porcs (90, 91). La colistine est largement utilisée en DPS chez les porcs, en raison de son activité contre les BGN. Une étude en France en 2008 a révélé que 90% des élevages de porcs utilisent la colistine pendant la période suivant le sevrage (92).

En 2021, la demande mondiale de la colistine va atteindre 16,500 tonnes, ce qui en fait l'une des classes des antibiotiques les moins chères disponibles en médecine vétérinaire dans certains pays (93).

Actuellement, la réduction de l'utilisation de la colistine chez les animaux d'élevage, et en particulier chez les porcs, est fortement encouragée dans le monde entier et s'impose en Europe comme mesure de santé publique visant à réduire la propagation de la résistance à la colistine et à prévenir la perte d'efficacité de la colistine en médecine humaine (94).

De plus, un traitement concomitant à la colistine chez les porcelets était associé à l'isolement de bactéries résistantes dès les premiers jours de traitement (95). Presque toutes les études conduites sur des espèces d'entérobactéries ont montré que des isolats résistants à la colistine hébergeant ce gène présentaient également une résistance à une ou plusieurs classes d'antimicrobiens classiquement utilisés chez le porc, tels que: aminoglycoside, sulfonamide, tétracycline, quinolone, β -lactame et céphalosporine (96-98).

Cependant, pour assurer la productivité des porcs et réduire la mortalité en post sevrage, des solutions ont été développées pour réduire l'utilisation de la colistine dans le secteur d'élevage porcin et pour lutter contre les infections bactériennes.

IV) La colistine : connaissances actuelles et utilisation clinique

IV-1) Généralités

La colistine est un antibiotique de la famille des polymyxines. Cette famille d'antibiotiques compte 5 membres soit les polymyxines A à E (99). Cependant, seulement les polymyxines B et E sont utilisées en médecine humaine et/ou vétérinaire. Cette famille d'antibiotiques fut découverte vers la fin des années 1940, plus précisément en 1947 avec la polymyxine B qui est produite par *Bacillus polymyxa* (99, 100). La polymyxine E aussi appelée colistine a été découverte en 1949 au Japon par Kayoma et al. (1949) ; elle est synthétisée par *Bacillus polymyxa subsp. colistinus*. Elle est initialement utilisée en thérapeutique au Japon et en Europe dans les années 1950 et aux Etats-Unis sous forme de Colistine Méthane Sulfonate (CMS) en 1959 pour le traitement des infections dues à des bactéries à Gram-négatif (99, 101). La colistine est également employée sous forme de solutions cutanées ou ophtalmiques, de suspension auriculaire ou par voie intramammaire (102).

IV-2) Structure chimique

La colistine, ou polymyxine E, est un antibiotique peptidique ayant un poids moléculaire d'environ 1750 Da. Elle est constituée d'un décapeptide (10 acides aminés). Ce décapeptide contient trois acides aminés soit la D-leucine, la L-thréonine et l'acide L- α , γ -diaminobutyrique (DAB). Elle résulte d'un mélange complexe d'une trentaine de molécules, parmi lesquelles sont majoritaires la colistine A (polymyxine E1) et la colistine B (polymyxine E2) (103). La proportion respective de chacun de ces 2 constituants peut varier selon le lot de fabrication (104). La colistine A et la colistine B diffèrent par une chaîne d'acide gras en position terminale : l'acide méthyl-6-octanoïque pour la colistine A et l'acide méthyl-6-heptanoïque pour la colistine B (**Figure 14**).

Du fait de la présence des 5 groupements γ -amines libres des DAB, la colistine est un cation au pH physiologique. De plus, la colistine est une molécule hétéropolaire ; avec une partie apolaire, la chaîne alkyle terminale et une partie polaire, la partie peptidique de la molécule. Cette structure lui confère des propriétés tensio-actives (dénaturation des membranes bactériennes). La portion hydrophile (partie peptidique) lui confère une légère hydrosolubilité (ayant pour conséquence une distribution extracellulaire) et la portion lipophile (chaîne alkyle) lui confère une affinité pour les phospholipides membranaires. Ce

caractère amphiphile permet à la colistine de se lier de manière non spécifique à de nombreuses surfaces (105)

La colistine est considérée comme une base (pKa~10) et est **principalement hydrophile** malgré la présence d'acides gras. Aux valeurs de pH physiologiques, cette molécule est considérée comme **un polycation** en raison de ses 5 groupements amine positifs (101). La colistine, principalement utilisée sous forme de sels de sulfate, est une molécule relativement stable, que ce soit en milieu aqueux ou dans le plasma (106). Cette charge nette positive cationique lui confère la propriété de réagir avec les groupes phosphates du lipide A du LPS, qui sont chargés négativement, et par conséquent d'avoir des propriétés antibactériennes (107).

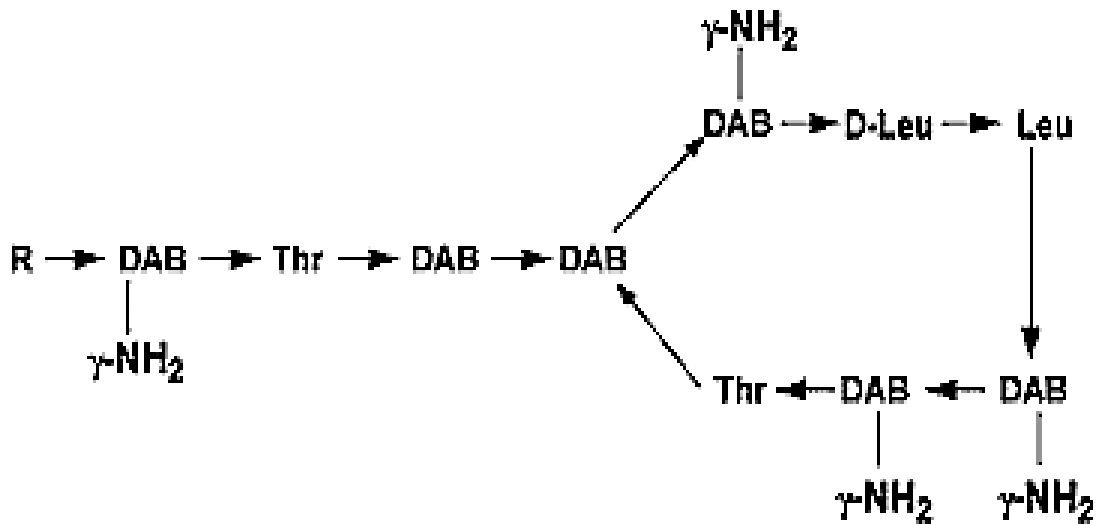


Figure 14 : Structure de la colistine A et B (polymyxine E1 et E2). Polymyxine E1 (colistine A) : R : acide 6-méthylheptanoïque ; DAB : acide polymyxine E2 (Colistine B) : R : acide 6-méthylheptanoïque ; DAB : acide α - γ diaminobutyrique ; Thr : thréonine ; Leu : leucine (108, 109).

IV-3) **Activité antibactérienne et mécanisme d'action**

Les mécanismes d'action de la colistine sont considérés comme quasi-semblables à ceux de la polymyxine B car leur structure ne diffère que par un seul acide aminé. Cette dernière ayant été plus étudiée, elle fait figure de modèle d'étude pour l'ensemble des polymyxines (107).

La cible principale des polymyxines est le lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ce qui aboutit à la lyse bactérienne en plusieurs étapes (Figure 15).

- (i) Le lipide A de la partie externe du LPS est chargé négativement et interagit avec certains cations divalents (calcium et magnésium essentiellement) permettant une stabilisation globale de la membrane externe. La colistine, possédant une charge globale positive, a donc une affinité forte avec le LPS pour s'y lier.
- (ii) Cette liaison entraîne un déplacement des cations par interaction électrostatique (110) ce qui provoque une désorganisation de la structure membranaire avec libération du LPS.
- (iii) La colistine s'insère ensuite dans la membrane externe grâce à sa chaîne d'acides gras lipophiles (111).
- (iv) La colistine entraîne une altération de la perméabilité de cette membrane externe (112) lui permettant de s'insérer et d'atteindre la membrane interne.
- (v) Une désorganisation de cette membrane interne se produit alors par rupture de l'intégrité de la bicouche de phospholipides (111).
- (vi) Au final, la lyse de cette membrane entraîne le relargage du contenu intracellulaire et la mort de la bactérie (111, 113).

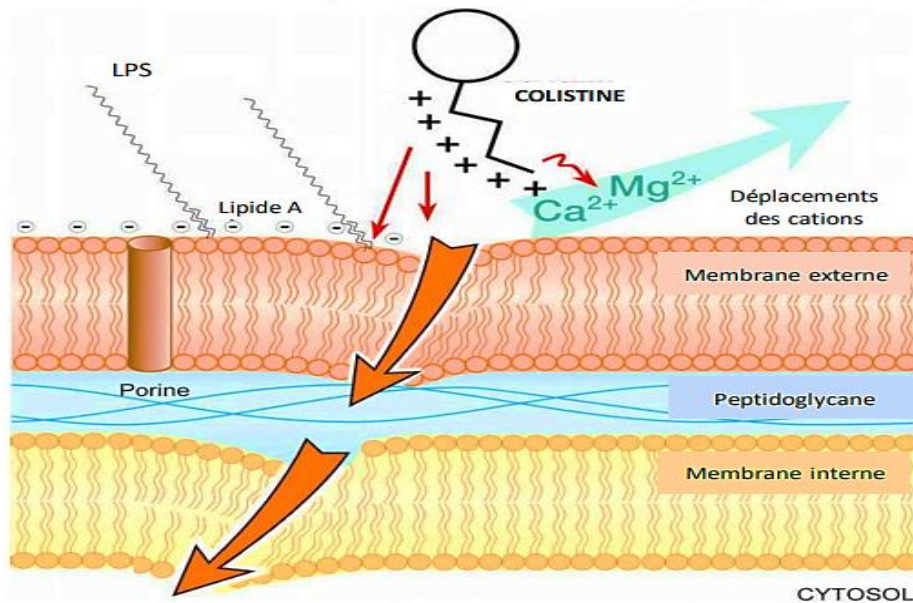


Figure 15 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane interne des bactéries à Gram-négatif. LPS: lipopolysaccharide (114).

Ce processus est le plus communément admis pour expliquer l'action antibactérienne de la colistine mais les mécanismes ultimes aboutissant à la mort cellulaire restent à définir (114).

D'autres mécanismes possibles ont été identifiés. Le « *vesicle-vesicle contact* » est lié à des échanges lipidiques entre membrane interne et externe après franchissement de la

membrane externe des bactéries par une polymyxine. Ceci provoque des modifications structurales des membranes, avec comme conséquence un déséquilibre osmotique qui lyse la bactérie (115, 116). Cependant, ceci n'a été observé que pour la polymyxine B.

Enfin, l'accumulation de radicaux libres liée à l'induction d'un stress oxydatif par les polymyxines est une voie d'action récemment découverte. Ces radicaux libres vont par la suite être responsables de dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides aboutissant à la mort bactérienne (117).

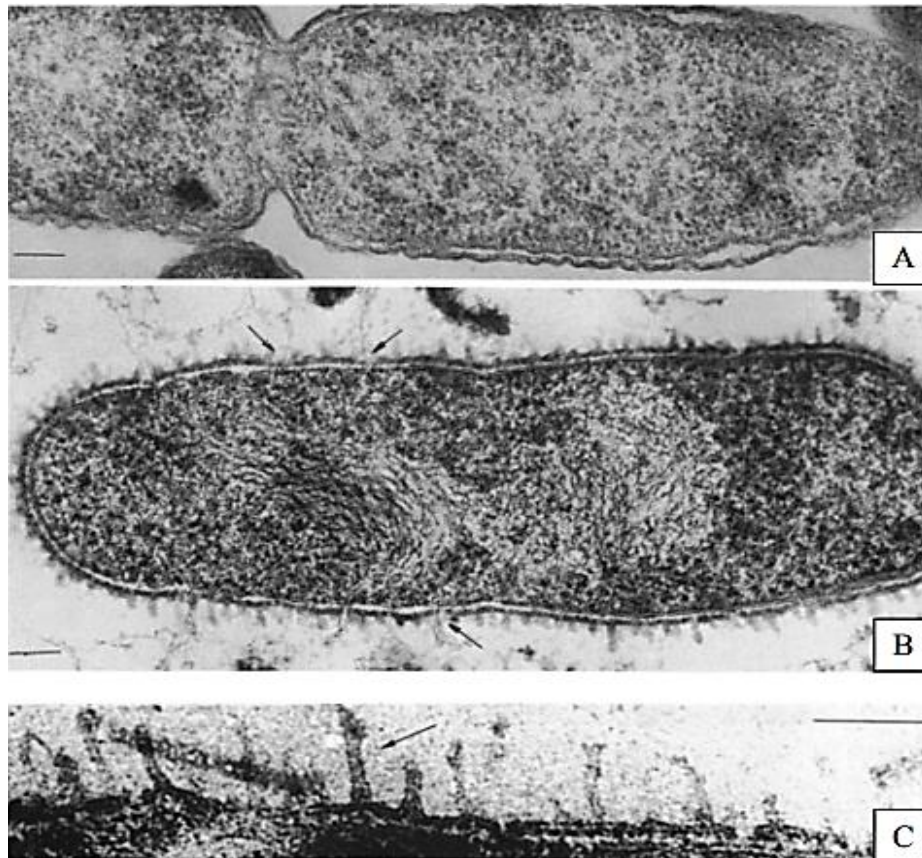


Figure 16 : Photo de microscopie électronique à transmission de *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) (A) non traité à un grossissement de 74 000× ; (B) traité avec 25 µg de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 74000× ; (C) traité avec 25 µg de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 190 000× (118).

IV-4) Spectre d'activité

La colistine est une molécule bactéricide, à spectre étroit, dirigée contre une majorité de bactéries à Gram-négatif (BGN). Ainsi les espèces classiques d'*Enterobacteriaceae*, *Acitenobacter*, *P. aeruginosa* et *Aeromonas* y sont naturellement sensibles. Les bactéries à Gram-positif usuellement trouvées en pratique clinique sont naturellement résistantes, ainsi que les bactéries anaérobies et les mycoplasmes (101). *In vitro* la colistine a un effet

bactéricide très rapide et se comporte comme un antibiotique concentration-dépendant avec les souches de *P. aeruginosa* ([112](#), [119](#)).

IV-5) Usages et problématiques

La colistine est un antibiotique utilisé régulièrement en médecine vétérinaire depuis les années 1950, notamment dans les filières animales d'élevage, et principalement utilisée chez des animaux jeunes, à la fois comme traitement curatif et préventif. Elle est utilisée pour le traitement oral de groupes d'animaux de rente.

En médecine humaine, l'usage de la colistine a longtemps été écarté des protocoles de soins, en raison de sa toxicité rénale ([120](#)). Elle a été réintroduite comme traitement de dernier recours lors d'infections sévères, notamment nosocomiales, lorsque celles-ci étaient causées par des bactéries résistantes aux autres traitements. Jusqu'en 2015, l'absence de mécanisme de résistance à la colistine (transférable entre bactéries) constituait un argument scientifique fort pour son utilisation dans ce cas. Mais, depuis le 18 novembre 2015, le premier mécanisme de résistance à la colistine transférable a été décrit en Chine chez des bactéries infectant des porcs et des poulets, mais aussi chez des souches bactériennes isolées chez des patients hospitalisés ([121](#)). On a récemment découvert, sur des éléments génétiques mobiles (plasmides), trois gènes, baptisés *mcr1*, *mcr-2* et *mcr-3*, qui provoquent une résistance à la colistine ([122](#)). On craint que cette résistance plasmidique à la colistine ne se transmette aux agents pathogènes déjà multirésistants et qu'il soit de ce fait beaucoup plus difficile de traiter les êtres humains et les animaux tombés malades suite à une infection par ces agents pathogènes ([123](#)).

IV-5-1) Usage en médecine humaine

La colistine a été utilisée par voie systémique et/ou par nébulisation de façon assez minoritaire pendant des décennies en raison de problèmes de toxicité. Seuls les patients atteints de mucoviscidose étaient traités par cet antibiotique pour contrôler les complications infectieuses ([124](#)).

Depuis une dizaine d'années, le regain d'intérêt de l'utilisation de la colistine est lié à l'augmentation des infections nosocomiales dues à des BGN multirésistants, notamment *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae* ([101](#), [108](#)). Cet antibiotique est maintenant considéré comme une molécule de choix de dernier recours et est majoritairement utilisé sous

forme de CMS par voie intra-veineuse pour combattre les infections dues à des BGN résistantes aux carbapénèmes, comme *K. pneumoniae* par exemple (125); mais aussi sous forme d'inhalation pour traiter les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (ou par des patients atteints de mucoviscidose), qui sont dues à *P. aeruginosa* ou *A. baumannii* multirésistantes (126).

Une méta-analyse récente a souligné l'intérêt et l'efficacité de l'usage en médecine humaine de cette voie nébulisée pour combattre ces infections respiratoires, en plus d'une toxicité probablement moindre que par voie intraveineuse (127). Cependant, d'autres études sont encore nécessaires pour confirmer ces résultats. En outre, l'association de la colistine avec d'autres antibiotiques tels que la tigécycline ou des carbapénèmes s'avère nécessaire et efficace pour combattre certaines entérobactéries productrices de carbapénémases (128).

Les infections par *A. baumannii* multi-résistantes sont un réel problème dans les unités de soins intensifs néonatales (129). Ainsi, la colistine est également utilisée chez l'enfant pour lutter contre les infections dues à des BGN multi-résistantes. L'efficacité semble être prouvée avec un intervalle allant de 72 à 98% de patients guéris selon les études (130), même si les comparaisons sont délicates car les posologies utilisées sont variées. Une récente étude sur 94 enfants a montré que l'efficacité des traitements à la colistine n'était pas moindre que pour ceux sans colistine, dans un contexte d'infections à BGN multi-résistantes (131).

Ainsi, la consommation hospitalière totale de colistine en Europe a augmenté d'environ 50% entre 2010-2014 et de 34% entre 2014-2016 (ECDC 2017) (132), cette consommation est en lien avec l'augmentation de BGN pathogènes multi-résistants. Cependant, les tendances de consommation des polymyxines (colistine en majorité) de chaque pays de l'UE sont assez variées (**Figure 17**). Selon le rapport de l'agence européenne de la surveillance des maladies (ECDC), la consommation de colistine en France dans le secteur hospitalier a diminuée de 0.007 DDD pour 1000 habitant /jour en 2016 à 0.0039 DDD pour 1000 habitant /jour en 2017(133).(Figure 18).

Country	2012	2013	2014	2015	2016
Finland (a)	0	0	0	0	0
Lithuania	0	0	0	0	0
Norway	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Sweden	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Latvia	0.003	0.002	0.001	<0.001	0.002
Netherlands	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002
Bulgaria	0	0	0.002	0.004	0.004
Estonia	0.002	0.001	0.002	0.003	0.005
Luxembourg	0.005	0.006	0.003	0.005	0.005
Denmark	0.002	0.003	0.006	0.005	0.006
Ireland	0.015	0.015	0.013	0.008	0.006
United Kingdom		0.005	0.006	0.006	0.006
France	0.008	0.008	0.008	0.007	0.007
Belgium	0.006	0.008	0.008	0.007	0.008
Slovenia	0.003	0.003	0.005	0.005	0.008
Hungary	0.005	0.006	0.007	0.008	0.010
EU/EEA	0.014	0.012	0.012	0.015	0.016
Malta	0.002	0.006	0.011	0.020	0.016
Croatia	0.029	0.003	0.019	0.018	0.017
Cyprus	0.013*	0.023*	0.023*	0.023*	0.019*
Portugal (b)	0.019	0.020	0.019	0.022	0.022
Romania	0.020*	0.026*	0.027*	0.034*	0.026*
Italy	0.019	0.023	0.025	0.027	0.027
Poland			0.001	0.020	0.034
Slovakia	0.020	0.023	0.025	0.024	0.035
Greece	0.085	0.084	0.095	0.095	0.102

Figure 17 : Tendence de la consommation de polymyxines dans le secteur hospitalier, pays de l'UE/EEE, 2012-2016 (exprimé en DDD pour 1 000 habitants par jour) (ECDC, 2017)(132).

Antimicrobial class		DDD per 1000 inhabitants and per day	Percent
ATC Code	Name		
J01XA	Glycopeptide antibacterials	0.0382	30.8%
J01XB	Polymyxins	0.0039	3.2%
J01XC	Steroid antibacterials	0.0015	1.2%
J01XD	Imidazole derivatives	0.0504	40.7%
J01XE	Nitrofurant derivatives	0.0007	0.5%
J01XX	Other antibacterials	0.0293	23.6%
Total		0.124	100.0%

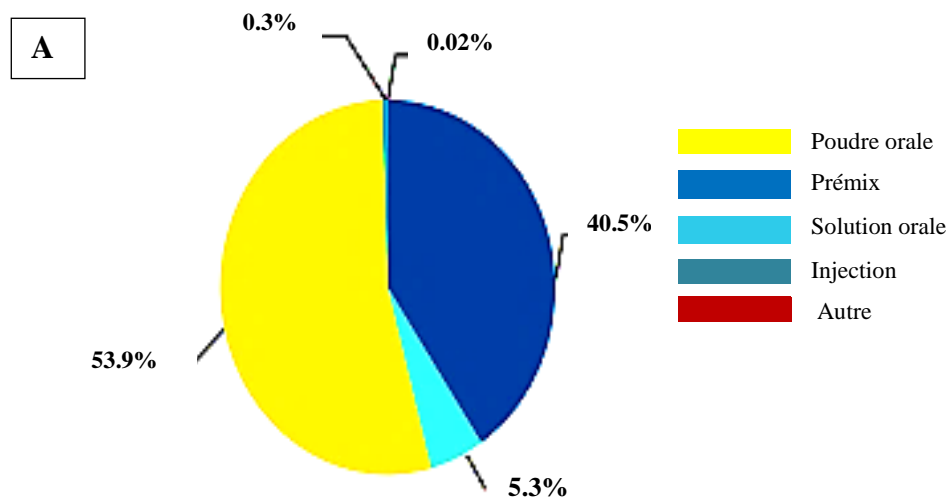
Figure 18 : Répartition de groupe ATC J01X antibactériens dans le secteur hospitalier en France, année 2017(ECDC 2018)(133).

De façon assez minoritaire, la colistine peut être utilisée par voie orale pour le traitement des diarrhées d'origine bactérienne chez l'enfant, ainsi qu'en topique pour des infections oculaires

et/ou auriculaires à *P. aeruginosa*. Un autre usage, assez controversé, concerne l'utilisation de cette molécule à visée de décontamination sélective du tractus digestif (SDD). Le but de ce traitement prophylactique est de prévenir les infections endogènes des voies respiratoires et du sang, et globalement réduire la mortalité chez les patients de soins intensifs ([134](#), [135](#)).

IV-5-2) Usage en médecine vétérinaire

La colistine, sous forme de sulfate par voie orale, est la forme très majoritairement utilisée en médecine vétérinaire et essentiellement à destination des animaux d'élevage en UE. Il s'agit d'un antibiotique principalement utile en médecine des populations, pour combattre les maladies digestives infectieuses dues à des BGN (*Enterobacteriaceae* majoritairement). La colistine est disponible sous différentes formulations (pré-mélanges médicamenteux, poudre, solution buvable) (**Figure 19**), et la grosse majorité des traitements est administrée dans les aliments, dans l'eau potable, par trempage ou par remplacement du lait ([124](#)). En 2016, la famille des polymyxines représentait les molécules les plus vendues en Europe, comptant pour environ 5.1% de tous les antibiotiques ([136](#)). Parmi les polymyxines, la colistine représentait plus de 99,9% des ventes. De plus, des combinaisons de colistine avec d'autres antimicrobiens sont autorisées dans certains États membres. Les ventes de ces produits combinés représentent moins de 10% du total des ventes de colistine ([124](#)).



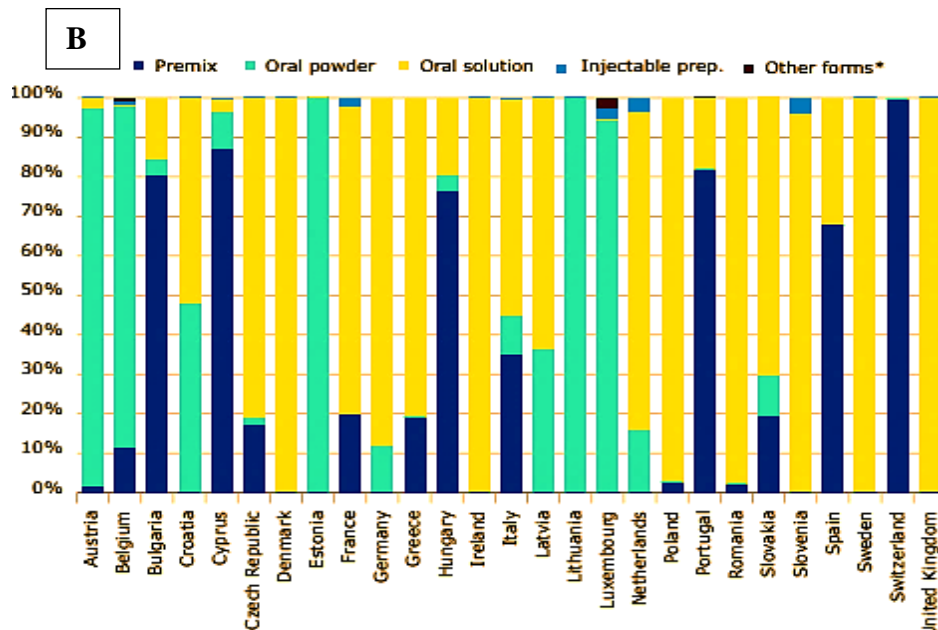


Figure 19 : Données de vente des polymyxines pharmaceutiques pour les animaux de production, en mg/PCU, selon la forme pharmaceutique, en Europe pour 2016 (136). A : les résultats globaux pour l’Europe ; B : le détail par pays (EMA : European Médecines Agency 2018). PCU : Population Correction Unit qui tient compte de la population animale ainsi que du poids estimé de chaque animal au moment du traitement antibiotique (136).

Sur la base de la consommation globale d'antimicrobiens, la colistine représentait plus de 30% de l'utilisation d'antimicrobiens chez le porc et de 15% dans l'élevage de veaux (124). En France, on estime qu'environ un-tiers de l'exposition totale des porcs aux antibiotiques est due à la famille des polypeptides (majoritairement la colistine) (92). Les traitements se font le plus souvent au moment du sevrage ou en post-sevrage afin d'enrayer les infections digestives due à *E. coli* qui surviennent suite aux perturbations du microbiote intestinal liées au changement d'alimentation. Ainsi, une étude menée en 2008 sur 83 élevages de porcs français a montré que 90% d'entre eux avait recours à la colistine en post-sevrage (137). Une diminution de cette proportion est notée dans ce type de production entre 2010 et 2013 mais avec toujours plus de 80% des élevages concernés (5).

La dose recommandée à visée thérapeutique chez le porc est de 100 000 UI/kg/jour pendant 3 à 5 jours (124). Des sous-dosages ont été rapportés en production porcine, possiblement dus à une mauvaise évaluation du poids des animaux ou d'un manque de précision dans le dosage (138, 139). Cependant, des surdosages peuvent également avoir lieu dans cette filière avec l'usage de doses de colistine supérieures aux recommandations de l'AMM (Autorisation de mise sur le marché) (140, 141), probablement pour limiter l'exposition de certains individus à des concentrations sub-thérapeutiques.

En outre, la consommation (rapportée à la biomasse exposée) varie de façon importante entre les pays de l'UE, les plus gros consommateurs étant les pays du sud de l'Europe (**Figure 20**). Au niveau mondial, il est difficile de déterminer les quantités réelles utilisées notamment en raison du manque de méthodes standardisées pour collecter les données ([94](#)).

En 2016, les quantités de colistine vendues en France sont inférieures au seuil de 5 mg/PCU préconisé par l'AMEG (Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group). Selon le rapport de l'ANSES sur la colistine (octobre 2016), une recommandation sur la diminution de l'usage de la colistine est établie à 50%. Cette recommandation a été reprise dans le plan Ecoantibio2 (Action 12) qui vise une réduction de 50% en 5 ans de l'exposition à la colistine en filière bovine, porcine et avicole en prenant comme référence l'ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials) moyen 2014-2015.

Entre 2014-2015 et 2016, l'exposition à la colistine a diminué pour les bovins (-43,4%), les porcs (-51,6%), et les volailles (-26,7%) ([142](#)). Le dernier rapport de l'ESVAC fait état d'une diminution globale de 19% des ventes de polymyxines dans 23 pays au cours de l'année 2017.

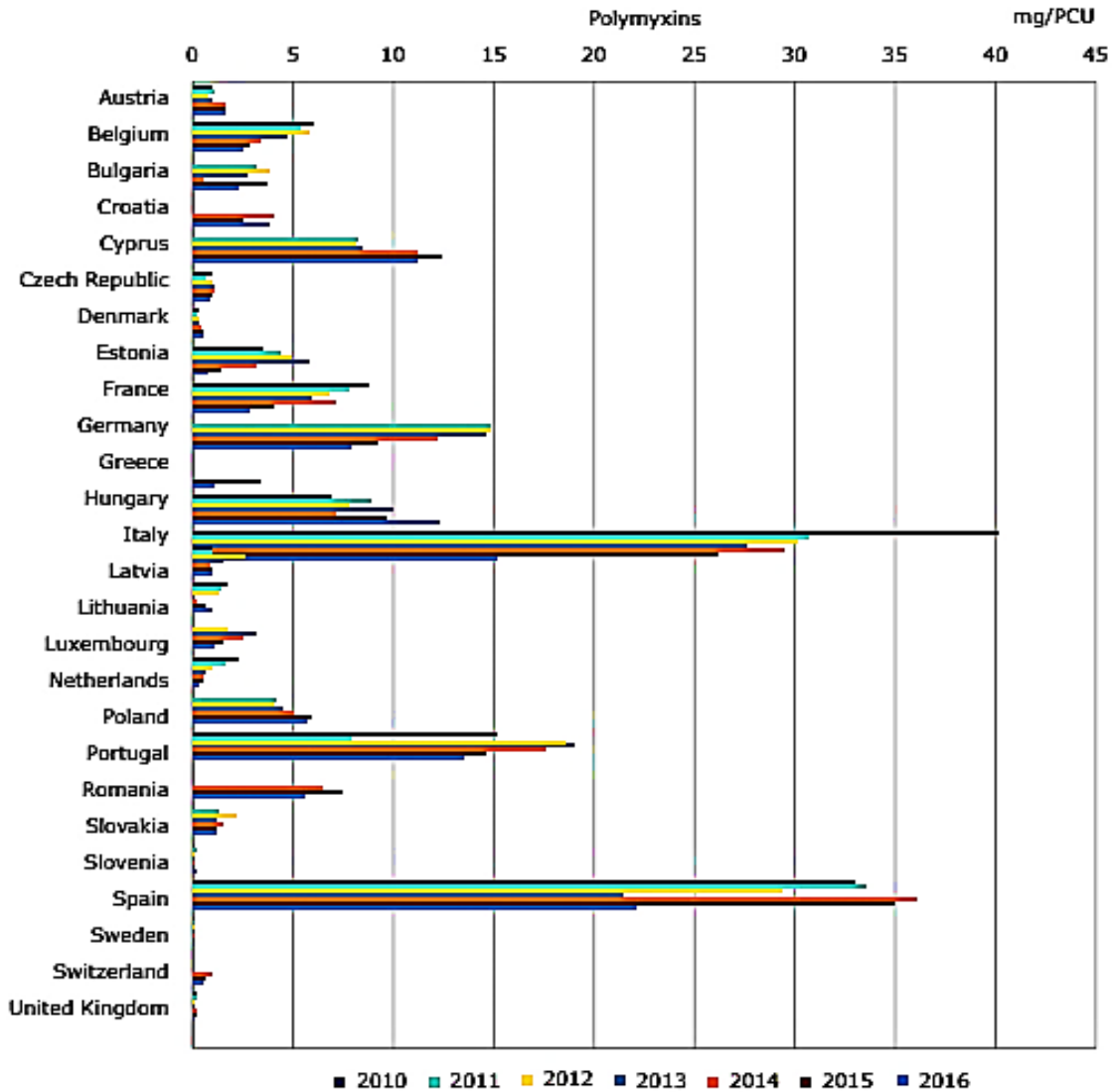


Figure 20 : Vente de polymyxines à destination des animaux dans les pays de l'UE entre 2010 et 2016 (136). PCU : « Population Correction Unit» qui tient compte de la population animale ainsi que du poids estimé de chaque animal au moment du traitement antibiotique (source EMA 2018).

Concernant l'usage de la colistine comme facteur de croissance (voie orale) pour les animaux d'élevage, cette pratique est interdite en Europe depuis 2006 pour tout antibiotique. Cependant, certains pays hors de l'Europe, notamment en Asie, ont recours à cet usage à des doses sub-optimales (143), entraînant alors un risque de sélection de résistance à cet antibiotique (144).

En 2015, la Commission Européenne, après saisine de l'EMA, s'est positionnée sur les modalités d'utilisation de la colistine par voie orale chez les animaux de productions (145). Ceci a été effectué en raison des disparités de posologies et de temps d'attente existants entre

les pays de l'UE (90). Le rapport mentionne que les indications prophylactiques sont abandonnées et seuls les traitements métaphylactiques sont acceptés : il s'agit des situations pour lesquelles dans un groupe d'animaux en contact, si certains expriment des signes cliniques alors que les autres sont suspectés d'être en phase d'incubation, l'ensemble des individus est traité. La commission précise cependant que la présence du pathogène et/ou de la maladie doit être confirmée dans le groupe d'animaux avant que le traitement ne débute. En outre, la durée de traitement ne devait désormais pas dépasser 7 jours et l'indication de traitement des salmonelloses doit être retirée des RCP car les données cliniques ne sont pas concluantes. Au final, le rapport bénéfice/risque de l'utilisation de la colistine par voie orale chez les animaux de rente était considéré comme favorable (145). Une autre décision de la Commission Européenne a été publiée en 2016 afin de supprimer toutes les AMM des médicaments contenant de la colistine en association avec d'autres antibiotiques par voie orale, en raison du manque de preuve scientifique sur le bénéfice d'une telle association par rapport à la colistine seule.

Cependant, suite à la découverte de gène de résistance plasmidique à la colistine fin 2015, un autre rapport a été produit en 2016 par l'EMA pour évaluer les risques associés à cette découverte. Les conclusions principales de ce rapport ont été la préconisation d'une baisse globale de l'utilisation de la colistine dans les pays européens, avec un seuil cible de 5 et 1 mg/PCU pour les forts et moyens consommateurs de colistine, respectivement ; la mise en place de stratégies pour un meilleur usage de la colistine (amélioration de la biosécurité des élevages, etc.) ainsi que des alternatives à cette molécule (vaccins...) ; et la recommandation de classer la colistine comme antibiotique d'importance critique. Ces recommandations n'ont pas forcément été reprises au niveau national car par exemple, en France, l'Anses s'est positionnée en faveur de la non-inscription de la colistine parmi les antibiotiques d'importance critique. Parmi les justifications, il est précisé que ce choix, a été fait notamment pour éviter un report d'usage vers autres classes d'antibiotiques, en raison du bénéfice clinique toujours positif pour la colistine, mais tout en soulignant l'importance de diminuer son usage de moitié en 3 ans et d'en renforcer la surveillance (146).

IV-6) Problèmes de toxicité

IV-6-1) Néphrotoxicité

Historiquement, l'usage de la colistine a été abandonné en raison d'une néphrotoxicité élevée. Il est probable que cette toxicité ne soit pas aussi importante qu'anciennement

suggérée (113) en raison d'un manque d'études pharmacocinétiques et pharmacologiques à propos de cette molécule (101). Toutefois, ce phénomène n'est pas à négliger car des signes d'insuffisance rénale aiguë (IRA) seraient présents dans des proportions atteignant 60% des patients traités avec des polymyxines (CMS ou polymyxine B) (147). Il s'agit de l'effet indésirable majeur et limitant dans le choix des doses thérapeutiques.

- **Etudes cliniques et facteurs de risque**

La toxicité rénale associée à l'usage de polymyxine survient généralement dans les 5 à 7 premiers jours de traitements et est le plus souvent réversible après l'arrêt du traitement (148). L'augmentation du taux de créatinine sérique est le critère généralement observé dans ces cas-là mais d'autres symptômes tels qu'une hématurie ou une protéinurie peuvent également être présents (29, 149). Une méta-analyse récente comparant la polymyxine B et la colistine a montré que des signes de néphrotoxicité apparaissent dans 24 à 74% des patients traités avec du CMS (150). Les auteurs ont également conclu que la néphrotoxicité associée à la colistine était plus fréquente et plus précoce que pour la polymyxine B (150).

De nombreux facteurs de risque de néphrotoxicité ont été mis en évidence comme la dose de CMS utilisée (cumulée ou non), la durée du traitement, l'administration concomitante d'autres agents néphrotoxiques, l'existence de co-morbidités, l'âge, la sévérité de la maladie (151-153). Un modèle prédictif a même été développé pour identifier les patients à risque pour cette toxicité (154). Cependant, ces résultats ne font pas consensus : en raison des disparités importantes, de la présence de facteurs confondants et le manque d'harmonisation dans la définition de néphrotoxicité entre les différentes études, les facteurs de risque ne sont pas réellement bien définis (148, 153).

Ainsi, une étude rétrospective d'une cohorte de 258 patients traités par la colistine n'a montré aucun lien statistique entre la dose cumulée et la présence d'une néphrotoxicité (prévalence de 10% dans cette étude) (155). Une autre étude a démontré que ce lien existe mais seulement pour les patients avec une fonction rénale anormale (taux de filtration glomérulaire trop bas) (156). Enfin, deux études récentes chez des patients de réanimation ont conclu qu'une concentration plasmatique de colistine à l'équilibre supérieure à 2 mg/L pour l'une (157) et 2,42 mg/L pour l'autre (158) représenterait le facteur de risque majeur pour l'apparition de la néphrotoxicité. Ceci souligne que l'index thérapeutique de la colistine est

très étroit car obtenir des concentrations plasmatiques à l'équilibre supérieures à 2 mg/mL est l'objectif pour un effet thérapeutique (159).

Concernant les populations pédiatriques, des désordres ioniques tels qu'une hypomagnésie ou une hypokaliémie sont décrits parmi les effets secondaires les plus fréquents (160, 161), mais des effets néphrotoxiques sont également rapportés. Ce taux varie entre 0 et 19% selon les études (130, 162-168), mais cette valeur est, là aussi, difficile à comparer entre études en raison des disparités dans les doses utilisées. Si une majorité d'études conclut que l'usage de la colistine dans les populations pédiatriques semble globalement sûr, certains auteurs soulignent néanmoins la nécessité d'un suivi rapproché de la fonction rénale durant le traitement (169).

- **Mécanismes impliqués**

La colistine a tendance à s'accumuler dans les cellules tubulaires proximales, comme décrit précédemment et il est très fortement suspecté que ce phénomène produit les effets toxiques (170, 171). Cette néphrotoxicité induite par les polymyxines se traduit notamment par une apoptose précoce des cellules tubulaires, un arrêt du cycle cellulaire, une diminution de l'excrétion urinaire et du stress oxydatif (172-174). Pour l'apoptose des cellules tubulaires, l'activation de la voie des caspases liées aux « *récepteurs de mort* » et aux mitochondries semble être le mécanisme principal *in vitro*. Ceci est corroboré par des études d'imagerie ayant montré que la colistine se fixe, au moins en partie, sur les organites comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique (170, 175). L'implication de ces mécanismes, en plus de la voie faisant intervenir le réticulum endoplasmique, dans la néphrotoxicité de la colistine a également été prouvée *in vivo* chez la souris (176) (**Figure 21**).

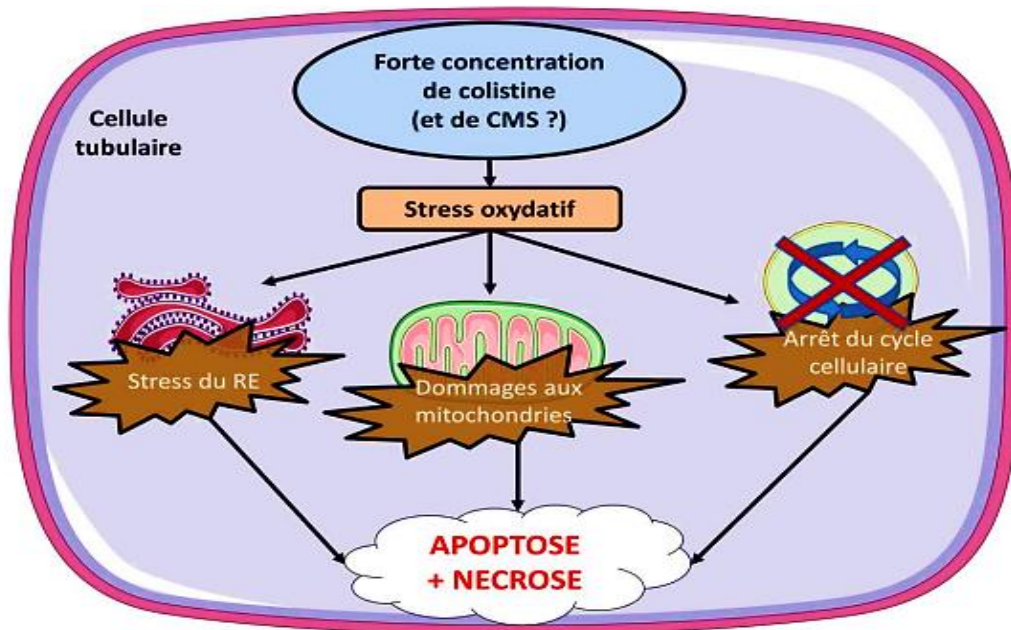


Figure 21 : Principaux mécanismes cellulaires responsable de la néphrotoxicité induite par la colistine (et potentiellement le CMS) (176).

En bilan, le mécanisme exact lié à la néphrotoxicité reste globalement méconnu et il est par conséquent nécessaire de faire des études complémentaires à ce sujet pour améliorer la sécurité d'utilisation des polymyxines (177).

IV-6-2) Neurotoxicité

Des cas de toxicité neurale ont été rapportés dans la littérature jusque dans les années 1990 suite à l'utilisation de polymyxines par voie intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM), se traduisant par des vertiges, une faiblesse musculaire généralisée ou non, une paresthésie faciale et périphérique, une surdité partielle, des troubles visuels, un vertige, une confusion, des hallucinations, des convulsions, une ataxie et un blocage neuromusculaire. Les paresthésies semblent être généralement bénignes et leur mécanisme ne semble pas être lié à l'interférence avec la transmission nerveuse (149). La neurotoxicité liée à l'utilisation de la colistine serait due à une interaction directe entre la molécule et les neurones et serait dose dépendante. L'utilisation concomitante des polymyxines avec d'autres médicaments tels que les corticoïdes ou des relaxants musculaires est rapportée comme facteur de risque de cette toxicité. Ces effets neurologiques disparaissent rapidement lorsque le traitement est arrêté (149).

Quelques cas de neurotoxicité ont été rapportés après les années 2010, chez des patients atteints de mucoviscidose et traités avec du CMS par voie IV (paresthésie, maux de tête, vertige) (178). Les perfusions de CMS effectuées sur une période trop courte (30 min) sont suspectées d'être à l'origine de ces effets toxiques mais un lien avec une diminution de la fonction rénale d'un des patients n'est pas à exclure (178). La faible incidence des cas de neurotoxicité est en accord avec la faible pénétration de la colistine dans le système nerveux central, qui a été estimé à 5% environ chez des patients de réanimation (179).

IV-7) Colistine et antibiorésistance

Comme tout antibiotique, l'utilisation de la colistine a provoqué l'apparition de résistances à l'encontre de cette molécule, que ce soit en médecine vétérinaire ou en médecine humaine.

IV-7-1) Méthode de détection de la résistance

Traditionnellement, la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique se base sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à cet antibiotique. La méthode de référence à l'heure actuelle pour déterminer la sensibilité des souches à la colistine (concernant les Entérobactéries, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp*) est la méthode de microdilution en bouillon (en milieu liquide) selon le standard ISO 20776-1 (120). Il est notamment précisé d'utiliser un milieu ajusté en cations, de réaliser le test avec la colistine sulfate (pas le CMS) et d'utiliser du matériel à base de polystyrène. Cependant, pour des raisons de coût et de souplesse d'utilisation, notamment concernant le choix des antibiotiques indiqués chez les animaux et qui sont à tester en parallèle à la colistine, cette méthode est pour l'instant mal adaptée aux laboratoires d'analyses vétérinaires. La méthode des disques reste donc la plus largement utilisée, avec ses avantages (coût, souplesse, facilité de mise en œuvre) et ses inconvénients, notamment en ce qui concerne la colistine (143). En effet, pour cette molécule, il existe un problème de corrélation entre l'amplitude de la variation des diamètres de zones d'inhibition qui est faible et celle des CMI qui est plus importante et donc plus facile à mesurer et à catégoriser autour du seuil critique de 2 µg/mL (180).

IV-7-2) Mécanisme de résistance à la colistine chez *E. coli*

Pour résister à l'action de divers stimuli environnementaux dont les peptides cationiques antimicrobiens tels que la polymyxine B et la colistine, les bactéries à Gram négatif ont mis au point divers mécanismes de défense ([121](#)).

- **Résistance chromosomique**

Une partie des résistances acquises à l'encontre de la colistine sont dues à des mutations d'origine chromosomique et n'entraîne théoriquement aucun transfert horizontal de ces résistances, à savoir l'intégration du matériel génétique provenant d'une autre bactérie sans en être le descendant. Le mécanisme le plus courant est la diminution de la charge négative globale du LPS repoussant ainsi les molécules de polymyxines ([181](#)).

Chez les Entérobactéries, deux systèmes de régulation géniques bicomposées, PmrAB et PhoPQ, sont impliqués dans la modification du LPS ([121](#)). Ces deux systèmes régulent l'expression de gènes de la famille *pmr* qui ont une action sur la biosynthèse de lipide A en y ajoutant de la phosphoéthanolamine (pEtN) et/ou de la 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N) ([182](#)) (**Figures 22-23**). Une mutation dans l'un de ces 2 systèmes (ou les deux) conduit à sur-exprimer les gènes *pmr* et donc obtenir un LPS plus riche en pEtN et LAra4N. Il en résulte ainsi une charge nette positive du LPS empêchant la colistine d'interagir. L'implication de ces deux systèmes de régulation a été démontrée pour *P. aeruginosa* ([183-185](#)). Ces modifications provoquent l'augmentation de la CMI de la colistine, de 3 à 32 mg/L le plus souvent ([121](#)) mais des mutations particulières de *pmrB* peuvent provoquer des CMI au-delà de 512 mg/L pour certaines souches ([186](#)).

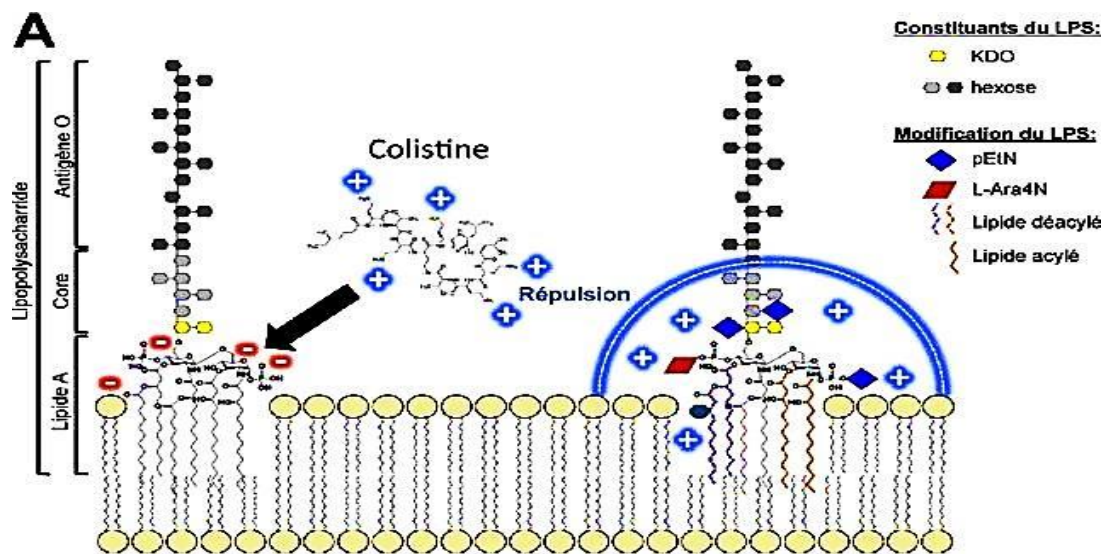


Figure 22 : Modification du lipide A et résistance aux polymyxines. A: Modification du LPS responsable de la diminution de l'électronégativité de la membrane externe et de la répulsion des polymyxines par ajout de pEtN et/ou L-Ara4N ; pEtN : phosphoéthanolamine; L-Ara4N :4-amino-4-désoxy-L-arabinose. KDO: 2-céto-3-désoxyoctonate (121).

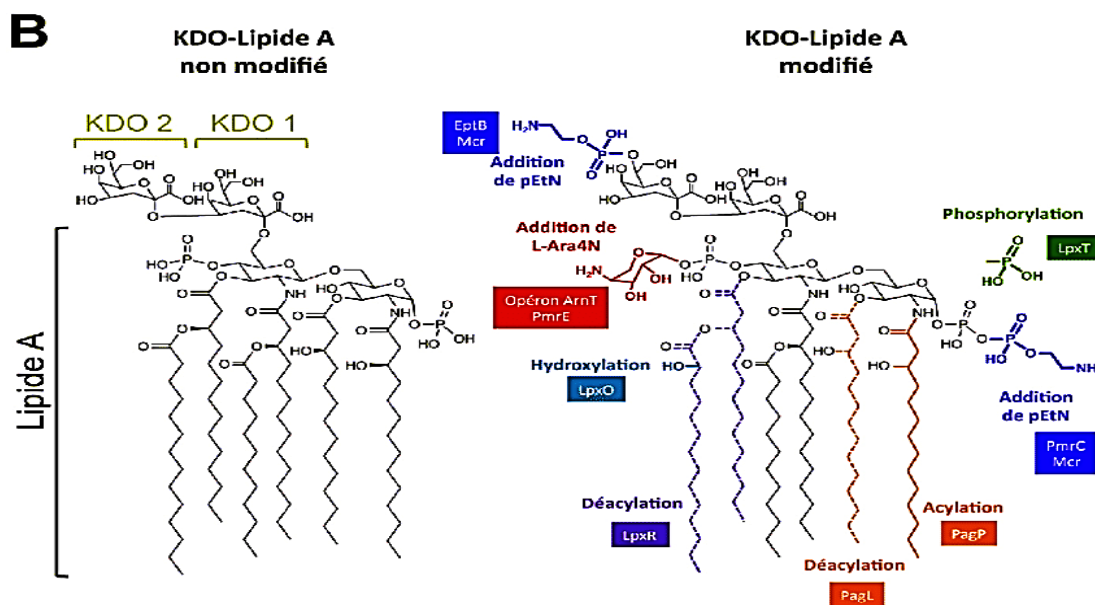


Figure 23 : B : Structures chimiques du lipide A natif et du lipide A modifiée. Les enzymes responsables des modifications du lipide A sont indiquées dans les rectangles colorés. D'après (Dortet et al. 2016). pEtN : phosphoéthanolamine; L-Ara4N :4-amino-4-désoxy-L-arabinose. KDO: 2-céto-3-désoxyoctonate (121).

L'activation du système PmrA et PhoP augmente également l'expression du gène *oprH* codant pour une protéine qui occupe les sites de fixation du magnésium sur la membrane empêchant ainsi la colistine de s'y fixer (187). Un autre mécanisme, majoritairement retrouvé chez les entérobactéries, est l'inactivation du gène *mgrB*. Ce gène code pour la protéine MgrB qui a une activité inhibitrice sur le système PhoPQ (Figure 24). Lors de mutation de *mgrB*, le système PhoPQ est surexprimé et aboutit, là encore, à un ajout de LAra4N sur le LPS (188). L'impact de ce type de mécanisme sur les valeurs de CMI à la colistine est plus important, ainsi les valeurs peuvent atteindre 64 mg/L (189).

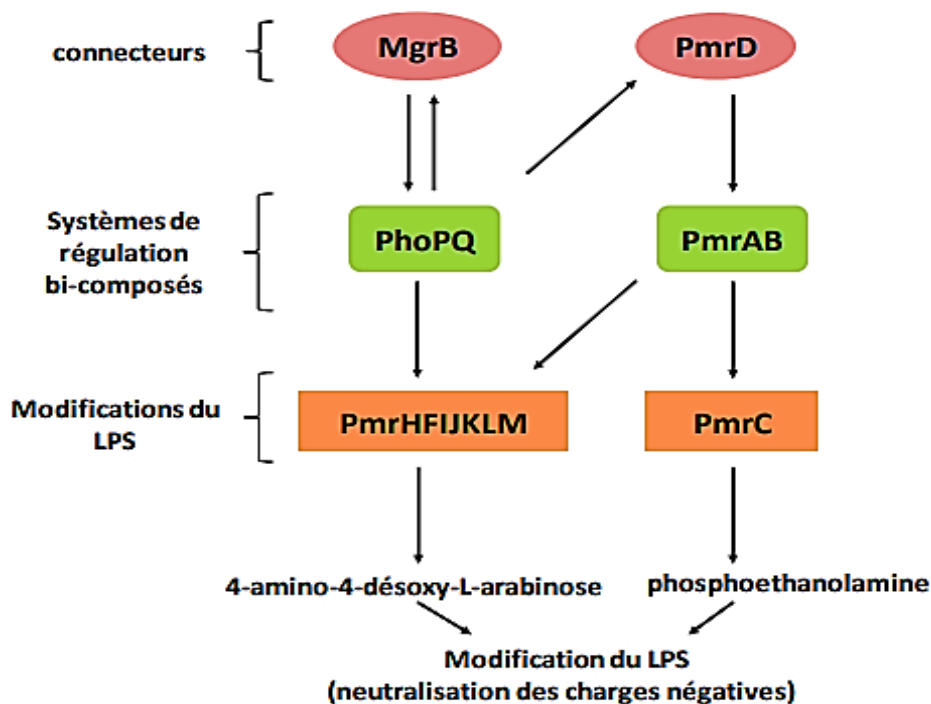


Figure 24 : Diagramme des gènes principaux impliqués dans la résistance à la colistine pour les bactéries à Gram négatif (182).

Cependant, certaines souches, dont le système PhoPQ, a été inactivé développent quand même des résistances à l'encontre de la colistine, démontrant l'existence d'autres mécanismes encore inconnus (113, 190). Les autres mécanismes de résistance indépendants de PmrAB et PhoPQ sont ceux impliqués dans la déacylation du LPS (191). En outre, divers autres systèmes régulateurs du LPS ont été mis en évidence comme le duo ParR-ParS chez *P. aeruginosa*, qui participe à la mise en place de la résistance adaptative chez les souches en contact avec des concentrations de colistine sub-optimales (192).

Globalement, il s'agit d'autres voies de modification du LPS qui restent encore à mieux étudier. Les polysaccharides de la capsule des bactéries pourraient également être

impliqués dans les phénomènes de résistance car les polymyxines pourraient s'y lier limitant ainsi leur accès à la membrane. Cependant, cette hypothèse ne fait pas consensus et certaines études la contredisent (191). Enfin, l'implication de certaines pompes d'efflux dans la résistance aux polymyxines est également avancée (193).

Des mutants col-R de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* ont pu être sélectionnés *in vitro* en faisant des cultures répétées sur des milieux avec concentrations croissantes de colistine (0,5 à 16 µg/mL), ce qui souligne la rapidité de la sélection sous pression d'antibiotique (194). Cependant, la stabilité de ces mutations diffère entre les souches puisque après passage répété sur milieu sans colistine, une majorité de *Pseudomonas* testés est redevenue sensible, contre une minorité pour *E. coli* et *Acinetobacter*, et aucune *klebsielle* (194). Un coût biologique semble donc associé aux mutations chromosomiques conférant la résistance à l'encontre de la colistine, même s'il ne concerne pas toutes les espèces bactériennes (*K. pneumoniae*). Ceci a été démontré pour des mutations au niveau du système PmrAB *in vivo* durant un traitement à la colistine ont un coût biologique pour *A. baumannii* (195). D'après Moskowitz et al. (2012), certaines souches de *Pseudomonas* très résistantes aux polymyxines (CMI > 512 mg/L) par ce même mécanisme peuvent perdre progressivement cette capacité après plusieurs passages *in vitro* dans un milieu sans antibiotique, soulignant le fort coût biologique associé à cette résistance (186). En conséquence, le coût biologique peut être associé à une baisse de virulence (comme chez *A. baumannii*), mais ceci dépend du mécanisme de résistance impliqué (196, 197), et la baisse de virulence n'est pas systématique (198). Au final, l'instabilité des résistances chromosomiques a longtemps été avancée comme expliquant le faible risque de diffusion de la résistance à la colistine (199).

- **Résistance plasmidique**

Ces cinq dernières années la résistance aux polymyxines a été de plus en plus régulièrement rapportée chez des souches hospitalières de *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* notamment du fait de l'augmentation de l'utilisation de ces molécules pour le traitement des infections causées par les souches productrices de carbapénémases. De plus, cette résistance n'était quasiment jamais rapportée chez *E. coli*. D'autre part, lorsqu'ils étaient étudiés, les mécanismes sous-jacents responsables de la résistance aux polymyxines correspondaient toujours à des mutations chromosomiques de gènes impliqués dans la modification de la charge du LPS. Ainsi, de par la complexité des mécanismes impliqués et la diminution de

fitness évoquée chez les souches résistantes aux polymyxines (200), la probabilité de retrouver un mécanisme de résistance transférable pour les polymyxines était assez largement rejeté par la communauté scientifique. Cependant, en novembre 2015, une équipe chinoise a montré pour la première fois l'existence d'un gène de résistance à la colistine porté par un plasmide, le gène *mcr-1* (pour plasmid-mediated colistin resistance) (201). Cette découverte a provoqué une vive réaction de la communauté scientifique internationale car, contrairement aux résistances chromosomiques, il existe un risque de diffusion de la résistance à la colistine par transfert horizontal. En outre, le taux de transfert des plasmides portant *mcr-1* dans cette étude avait une valeur élevée, de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-3} (201).

Le gène *mcr-1* code pour une phosphoéthanolamine transférase qui catalyse l'addition de pEtN sur le lipide A, provoquant une baisse d'affinité de la colistine pour le LPS comme pour les résistances chromosomiques (**Figure 24**) (201). Globalement, les niveaux de résistance associés à ce mécanisme semblent modérés, avec des CMI pour la colistine entre 4 et 16 mg/L (202) et entre 2 mg/L et 8 mg/L (121).

Une diversité importante de plasmides hébergeant *mcr-1* a ensuite été mise en évidence, avec des taux de transfert par conjugaison *in vitro* variables allant de 10^{-10} à 10^{-1} , avec même parfois aucun transfert plasmidique selon les souches (203). La majorité de ces plasmides pourrait se transférer aux Entérobactéries à des taux de 10^{-4} à 10^{-6} (204), soit de façon moins fréquente qu'initialement avancé (201). Cette multiplicité de plasmides laisse penser que la diffusion de *mcr-1* pourrait correspondre à divers événements génétiques distincts survenus de façon indépendante dans des régions géographiques éloignées (202). Il a rapidement été montré que le gène *mcr-1* est présent sur quasiment tous les continents (Asie, Europe, Afrique, Amérique du Nord) et de façon ubiquitaire puisque porté par des bactéries retrouvées chez l'homme, les animaux, dans les denrées alimentaires et l'environnement (205). En outre, le fait que les mêmes plasmides soient retrouvés chez des souches de bactéries de différents types illustre bien une diffusion ancienne (206).

En effet, Les plus anciennes souches de *E. coli* productrice de Mcr-1 ont été isolées en Chine à partir de poulets d'élevage dès les années 1980 (207) et au début des années 2000 en Europe (206).

Le réservoir d'origine de *mcr-1* est supposé être le monde animal, pour plusieurs raisons (208) :

- l'usage important de polymyxines chez les animaux d'élevage
- la prévalence de *mcr-1* bien plus importante chez les souches d'origine animale que pour celles isolées chez l'homme
- l'association de *mcr-1* avec des résistances au florfénicol (antibiotique seulement utilisé en médecine vétérinaire)
- l'association génétique de *mcr-1* avec une séquence d'insertion provenant de *Pasteurella multocida* (bactérie pathogène fréquente du monde animal)

En outre, des souches porteuses de *mcr-1* en association avec d'autres gènes de résistances à l'encontre d'antibiotiques de derniers recours ont été détectées, notamment des carbapénèmes chez des porcs (alors que l'utilisation des carbapénèmes est interdite chez les animaux de production) (209), mais aussi chez des entérobactéries isolées chez l'homme (202). Des co-localisations avec des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ont également été observées (206) et ne semblent pas rares en Chine (210).

Suite à la découverte du gène *mcr-1*, d'autres éléments génétiques mobiles ont été mis en évidence. Des variantes de *mcr-1* ont été identifiées, notamment *mcr-1.2* qui est un mutant ponctuel de *mcr-1* (99 % d'identité en acides aminés) dont la glycine en position 3 a été remplacée par une leucine. Ce variant du gène *mcr-1* a été identifié en Italie chez une souche de *K. pneumoniae* en association avec des gènes codant pour des carbapénèmes (211). Le gène *mcr-2* a été découvert chez des *E. coli* d'origine porcine et bovine en Belgique (212). Ce gène code également pour une phosphoéthanolamine transférase, mais distincte de celle issue de *mcr-1*, avec une homologie de séquence d'environ 70%. Si le mécanisme d'action est identique à celui de *mcr-1*, son mode de transmission serait différent et pourrait expliquer sa prévalence plus faible (213).

Le gène *mcr-3* a été détecté sur un plasmide chez un *E. coli* d'origine porcine en Asie (214). Des analyses comparatives de séquences ont mis en évidence l'existence de ce gène chez d'autres entérobactéries comme *K. pneumoniae* et *Salmonella* isolés chez des patients, soulignant une diffusion déjà en cours. Enfin, la forte homologie de séquence avec des gènes présents chez *Aeromonas* laisse penser que *mcr-3* proviendrait de cette espèce bactérienne (214).

Enfin, un gène *mcr-4* a été identifié chez *Salmonella* et *E. coli* provenant d'Espagne, d'Italie et de Belgique (215), illustrant une dissémination déjà importante de ce gène en Europe. La coexistence de plusieurs types de gène de la famille des *mcr* a été observée chez

un *E. coli* multi-résistantes d'origine bovine, portant *mcr-1* et *mcr-3*, sans réelle connaissance sur l'impact d'une telle association sur les niveaux de résistance à la colistine (215). A ce jour, 9 homologues de *mcr* ont été décrit (*mcr-1* à 9), le *mcr-9* a été détecté dans un génome de *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium (216).

Enfin la découverte future de nouveaux gènes de type *mcr* (ou d'autres gènes) est hautement probable, en lien avec les nouvelles techniques de séquençage à haut débit qui permettent une surveillance accrue (216, 217). En outre, certaines souches résistantes ne présentent aucune mutation chromosomique dans les gènes précédemment cités, ni ne portent de gènes transférables identifiés, illustrant ainsi que d'autres mécanismes restent à découvrir (218).

Contrairement aux mutations chromosomiques, la résistance plasmidique associée à *mcr-1* ne semble pas associer à un coût biologique ce qui lui permet de se maintenir, même en l'absence de pression de sélection (201).

IV-8) Problématiques « One Health » liées à la colistine

IV-8-1) Transmission et dissémination de *mcr-1/mcr-2/mcr-3*

La découverte de *mcr-1* a alarmé l'ensemble de la communauté scientifique sur la probabilité d'une diffusion des souches résistantes porteuses de ces gènes entre l'environnement, le monde animal et l'homme. En l'occurrence, des gènes *mcr-1* ont été retrouvés dans des plasmides similaires des mêmes espèces bactériennes isolées à partir d'animaux d'élevage, de denrées humaines et de l'environnement soulignant une possible transmission (124), plusieurs études appuyant cette hypothèse. Une transmission d'un *E. coli* non-pathogène porteur de *mcr-1* entre l'animal et l'homme est fortement suspectée en Asie, chez un jeune homme qui nourrissait ses porcs sans vêtements de protection (219, 220). En Chine, un échange entre animaux de compagnie (chien, chat) et l'homme est également avancée car des souches identiques d'*E. coli* portant *mcr-1* ont été retrouvées d'une part chez certains animaux et leurs propriétaires (221), et d'autre part chez un vendeur d'animaux et ces mêmes animaux (222). L'alimentation pourrait également jouer un rôle de transmission de ces bactéries résistantes. En effet, le portage sain de *E. coli* positif pour *mcr-1* dans les intestins des animaux abattus peut constituer un risque de contamination des viandes : de telles souches ont déjà été retrouvées dans les viandes de diverses origines (223). Ces souches peuvent ensuite se retrouver dans le microbiote intestinal du consommateur si la viande est

mangée crue ou mal cuite. Pour cette raison, certains auteurs préconisent un temps d'attente « microbiologique » (94) en plus du temps d'attente classique lors de l'usage d'un médicament chez un animal d'élevage.

De plus, la nourriture des animaux semble être une source potentielle de *mcr-1* car des souches porteuses du gène *y* ont été détectées (221). La caractérisation des souches positives pour *mcr-1* isolées depuis l'intestin d'enfants en Chine a montré l'existence d'une séquence d'origine aviaire, illustrant une probable transmission zoonotique (224). Au Vietnam, des éleveurs de poulets en contact avec des animaux porteurs de *mcr-1* avaient une prévalence significativement plus importante (34,7%) pour ce gène comparé aux éleveurs en contact avec des animaux négatifs (15,5%) (225). Enfin, *E. coli* est l'espèce bactérienne principalement porteuse de *mcr-1* ; or il s'agit d'une des bactéries les plus ubiquitaires et transmises parmi le tryptique animal-homme-environnement (202).

La globalisation du commerce des animaux et des produits (denrées, ...) ainsi que le transport de personnes sont des facteurs probables de dissémination de *mcr-1*. En effet, il a été prouvé que certains voyageurs revenant d'Asie (là où la prévalence de *mcr-1* est la plus forte) portaient de façon asymptomatique des souches positives pour *mcr-1* dans leur microbiote intestinal (226). Lors de rassemblements de personnes à forte densité, un échange de *mcr-1* entre individus est également suspecté (226, 227). L'importation des denrées est également pointée du doigt car des souches avec *mcr-1* ont été détectées en Suisse à partir de légumes venant d'Asie (228) alors qu'aucun gène *mcr-1* ni *mcr-2* n'a été détecté chez l'homme dans ce pays (228).

Concernant l'environnement, *mcr-1* a été retrouvé chez des souches présentes dans les stations d'épuration (229) et les rivières (228) à partir de légumes importés (228) ainsi que dans la faune sauvage, chez certaines espèces d'oiseaux migrateurs venant de différents continents (230, 231), et parfois même associé à d'autres gènes de résistance comme des BLSE (232). Ces résultats illustrent le risque de diffusion de cette résistance à la colistine.

L'utilisation massive de la colistine (par voie orale) chez les animaux d'élevage est perçue comme étant un risque majeur de sélection et diffusion de *mcr-1* (202, 223). Cependant, cet effet de causalité n'est pas toujours évident : en France, une augmentation de *mcr-1* dans les *E. coli* porteurs de BLSE chez les bovins depuis 2006 est noté malgré une baisse significative de l'usage de la colistine dans cette filière (206).

L'usage de la colistine comme facteur de croissance dans certaines régions du monde devrait être stoppée en raison de son fort risque de sélection de souches résistantes (94, 233). Cependant, des *E. coli* porteurs de *mcr-1* ont également été retrouvés chez des enfants âgés de 2 ans ou moins, sans historique de traitement avec des polymyxines, ni de contact avec des animaux (234). En outre, une souche positive pour *mcr-1* a été détectée chez un patient aux Etats-Unis alors que la colistine est interdite d'utilisation chez les animaux (235). Ces résultats suggèrent que l'usage de la colistine chez les animaux n'est probablement pas le seul déterminant de la diffusion de *mcr-1* et que de nombreuses autres voies de contamination existent (Figure 25).

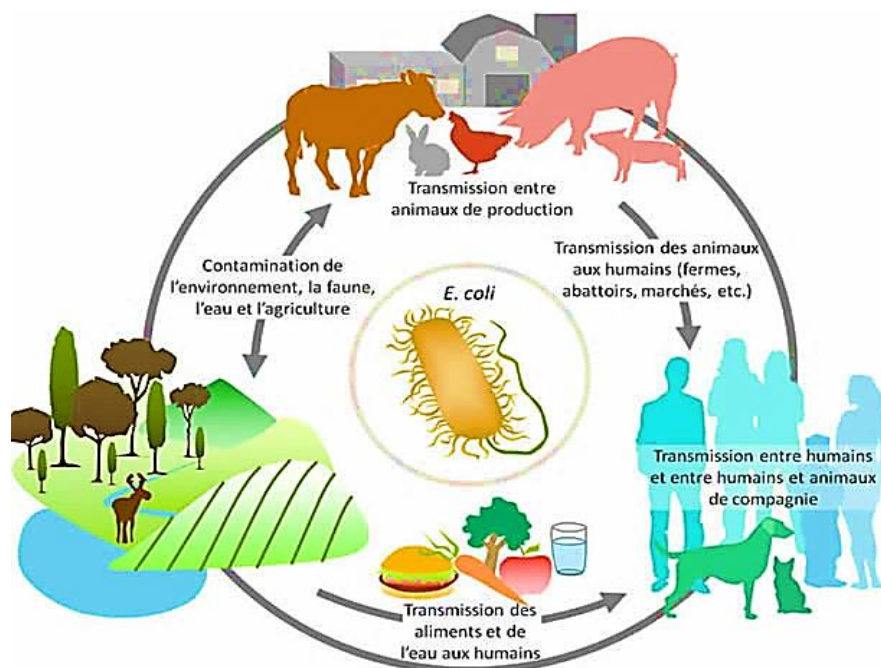


Figure 25 : Circulation d'*E. coli* résistant à la colistine, porteur du gène *mcr-1*, entre animaux, environnement et aliments (94).

La colistine étant relativement peu utilisée en médecine humaine, certains auteurs affirment que cet usage n'aura probablement qu'un impact limité sur la diffusion entre souches d'origine humaine (202) mais l'augmentation de son utilisation en médecine humaine dans les dernières années pourrait renforcer la pression de sélection et la dispersion de cette résistance portée par *mcr-1* (223). En revanche, il est souligné que si la colistine est devenu un antibiotique de dernier recours chez l'homme, c'est en raison du mésusage et de la sous-consommation des autres antibiotiques ayant entraîné la sélection de bactéries (multi)

résistantes (236). Or, *mcr-1* est fréquemment présent dans des souches portant d'autres résistances à divers antibiotiques (dont des BLSE ou des carbapénémases) (202, 237).

Certains auteurs avancent même l'hypothèse d'un lien historique entre ces types de résistances, soulignant ainsi que la réduction de l'usage de colistine seule ne suffira pas à prévenir la sélection de *mcr-1* (238). En Chine, une exposition préalable à des antibiotiques est décrit comme facteur de risque positif avec la présence de *mcr-1*, alors que la colistine n'est pas utilisée en médecine humaine dans ce pays (239). L'existence de gènes de co-résistance plasmidique avec *mcr-1* est l'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat. En conséquence, l'usage d'autres antibiotiques à la fois en médecine humaine et vétérinaire pourrait agir en co-sélection et maintenir/diffuser la résistance à la colistine associée à *mcr-1*. Ainsi, la gestion du risque lié à l'utilisation de la colistine doit ainsi être appréhendée de façon globale, sous le concept « One Health ».

Globalement, l'usage important de la colistine en médecine vétérinaire (notamment en production porcine), la découverte de gènes de résistance transmissibles (*mcr*), leurs prévalences plus élevées chez les souches d'origine animale ainsi que leur co-localisation avec d'autres gènes de résistance laissent craindre que la résistance à la colistine puisse se diffuser rapidement, être associée à des bactéries multi-résistantes, et se transmettre à l'homme.

V) Solutions pour lutter contre les infections bactériennes

Compte-tenu du nombre croissant de pathogènes résistants et multi-résistants aux ATBs auxquels nous devons faire face, la mise en place de stratégies pour lutter contre le problème de l'antibiorésistance est inévitable. La montée du phénomène de résistance aux principales classes d'antibiotiques, combinée au nombre limité de nouveaux agents antimicrobiens en cours de développement, a conduit à l'avènement de l'ère post antibiotique. Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue, contre lesquelles les bactéries seront incapables de développer une résistance.

À l'heure actuelle, les chercheurs développent deux axes principaux pour solutionner le problème : le développement de nouveaux antibiotiques efficaces, et l'élaboration d'une alternative aux antibiotiques.

V-1) Alternatives thérapeutiques

L'expression « alternatives aux antibiotiques » est de plus en plus utilisée, que ce soit dans les élevages et en particulier chez les porcs ou dans les médias. Depuis les années 90, de nombreuses entreprises s'intéressent aux produits alternatifs en élevage. Ils sont utilisés majoritairement, par les entreprises de la nutrition animale, en tant qu'alternatives dites nutritionnelles. D'autres produits alternatifs préviennent l'utilisation de traitements médicamenteux, directement en élevage. Une large gamme d'agents potentiellement dotés d'une activité antibactérienne a été étudiée, tels que des micro-organismes probiotiques, des peptides antimicrobiens, les huiles essentielles, des acides organiques, des oligo-éléments, des vitamines, des polyamines, la phytothérapie ainsi que des nanoparticules (240).

Les micro-organismes probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les a ingérés (241, 242). On les trouve dans les yaourts et ils stimulent le système immunitaire et peuvent prévenir ou traiter certaines infections. Les peptides antimicrobiens sont des antibiotiques endogènes ou naturels présents chez les animaux et végétaux. Les huiles essentielles sont des principes actifs concentrés. Elles peuvent donc être toxiques et dangereuses à certains dosages et/ou certaines voies d'administration. Elles sont intéressantes en production animale grâce à leur pouvoir antibactérien (243). Les acides organiques font partie des différents additifs alimentaires pouvant être ajoutés soit à l'alimentation des animaux, soit à leur eau de boisson (244). Les nanoparticules sont des objets de taille nanométrique ayant généré des applications considérables dans de nombreux domaines, allant du traitement de surface et de l'eau à l'industrie alimentaire, en passant par les cosmétiques, ainsi que de la médecine et le génie. Les nanoparticules semblent être des candidats de choix pour constituer une alternative aux antibiotiques et ouvrir la voie à une nouvelle stratégie antibactérienne à l'échelle industrielle (245).

Toutefois, ces alternatives ne semblent pas avoir d'efficacité absolue et elles ont été surtout testées comme une prévention des infections.

V-1-1) Les Nanoparticules

- **Généralités**

Le domaine de la nanotechnologie est défini comme la combinaison de la science et de l'ingénierie. La nanotechnologie peut toucher aussi bien le design, la synthèse et la

caractérisation des particules (246). Avec les problèmes de résistance aux antibiotiques, les nanoparticules sont devenues des candidats attrayants pour des applications médicales, grâce à leur capacité de détruire des microbes pathogènes. De nombreuses applications sont envisageables et l'importance des travaux scientifiques engagés permet d'espérer que les nanoparticules puissent prochainement figurer parmi les alternatives aux traitements anti-infectieux classiques (245).

- **Définition**

Le mot nanoparticule vient du grec « nano » qui signifie nain, et de particule qui désigne la quantité la plus infime d'un corps. Outre cet aspect étymologique, le préfixe nano désigne une échelle de grandeur de l'ordre du milliardième de mètre (10^{-9} m). Conformément à la norme européenne ISO TC 229, une nanoparticule est un objet qui a une taille comprise entre 1 et 100 nm soit 10^{-9} d'un mètre sur au moins une de ses dimensions (247-250).

Les nanoparticules sont classées selon leur origine : les nanoparticules d'origine naturelle (celles produites par les activités volcaniques, les réactions de photosynthèse, feux de forêt, des activités marines (aérosols de sel) et des transformations gaz/particules...) et les nanoparticules d'origine anthropique (celles produites par les nouvelles technologies et qui sont le résultat d'une activité humaine) (245). Elles peuvent être produites selon plusieurs procédés physico-chimiques ou biologiques qui vont des procédés de productions chimiques classiques jusqu'aux procédés totalement nouveaux et innovants

- **Les différents types des nanoparticules**

- **Nanoparticules non dégradables**

Ces NPs ont été développées pour obtenir de nouvelles propriétés découlant de leur taille. Elles possèdent un large champ d'applications. Cette catégorie regroupe des NPs rigides possédant des formes variées comme des sphères, des ellipses, des aiguilles, des tubes.... Ce type de NPs est biocompatible mais non biodégradable (251)..

- **Nanoparticules dégradables**

Ces NPs sont généralement composées de lipides, de sucres, ou de polymères dégradables et peuvent être dispersées dans des solutions aqueuses, des crèmes ou d'autres types de formulations. Les particules dispersées peuvent être solides, fluides ou dans un état de gel, rigides ou déformables. En fonction du type de matériau utilisé et du pH, les NPs

peuvent être chargées en surface. Cette caractéristique est très importante ; en effet, elle permet de s'affranchir des phénomènes d'agrégation (les particules chargées se repoussent). De plus, leurs tailles sont très variées s'étendant de quelques dizaines à mille nanomètres (251).

- **Propriétés des nanoparticules**

Une nanoparticule possède un ensemble de caractéristiques physicochimiques, notamment la taille, la charge de surface, la réactivité, la forme, la porosité ou encore l'hydrophobicité. Chacune de ces caractéristiques lui confère des propriétés uniques et particulières (exemples: réactivité, résistance, biocompatibilité, magnétisme, propriétés optiques) qui trouvent leurs intérêts dans de nombreuses applications (252). La fabrication de nouveaux matériaux de taille nanométrique peut conférer des propriétés nouvelles comparées aux mêmes matériaux, de même composition mais de plus forte taille. L'exemple type sont les particules d'or ; les particules d'or de quelques nanomètres de diamètre sont de couleur rouge et présentent une activité catalytique comme pour les réactions de l'oxydation du monoxyde de carbone ou la synthèse du méthanol. L'or classique est, par contre, jaune et inerte (253).

- **Applications des nanoparticules**

Les utilisations potentielles des nanoparticules s'étendent à des domaines allant de l'électronique, la métallurgie, l'agriculture, les revêtements, l'énergie, les catalyseurs à la pharmaceutique, le cosmétique, et à la biomédecine (245, 246). Une des principales applications biomédicales de nanotechnologie est l'administration de médicaments sous forme de nanoparticules, ce qui a permis l'amélioration des médicaments actuels et/ou l'élaboration de médicaments sur mesure délivrés uniquement à des organes précis de l'organisme, ce qu'on appelle vectorisation (252). Le développement rapide des nanotechnologies et les avancées scientifiques et technologiques majeures affectent de façon significative tous les domaines médicaux. Certaines nanoparticules composées d'atomes métalliques, comme l'argent, ou d'oxydes métalliques, constituent des agents très prometteurs pour les applications antibactériennes, antifongiques et/ou antivirales (245, 251).

- **Effets antibactérienne des nanoparticules**

L'activité antimicrobienne spécifique des nanoparticules attire l'attention des chercheurs et des médecins car nous avons besoin d'une alternative aux antibiotiques. Cela d'autant plus

qu'aujourd'hui, certaines souches bactériennes, comme *P. aeruginosa* ou les staphylocoques dorés, parviennent à résister à tous les antibiotiques connus.

Des bactéricides à base d'argent ou d'oxydes métalliques ont une longue tradition. Il y a plus de 50 ans qu'on utilise l'argent colloïdal pour minimiser les infections bactériennes. De même, ZnO et MgO sont couramment utilisés comme agents antibactériens dans des produits de cosmétique, ou dans des emballages et additifs alimentaires. La diminution de la taille de ces particules à l'échelle nanométrique a augmenté significativement leur efficacité antibactérienne.

▪ **Nanoparticules d'argent**

L'argent nanométrique ou « nanoargents » est l'un des nanomatériaux bactéricides les plus couramment utilisés dans les produits de consommation. Ces dernières années, les scientifiques ont fait des efforts pour immobiliser des nanoargents sur différents matériaux pour les rendre antibactériens. Parmi les applications biomédicales commercialisées, on trouve les cathéters résistants aux microbes ou les masques et les outils chirurgicaux. Les nanoparticules d'argent peuvent être synthétisées sous des formes variées et des diamètres différents. L'activité antibactérienne dépend principalement de leur taille, alors que la morphologie n'influence pas l'efficacité. Les nanoparticules d'argent sont plus efficaces et montrent l'effet de dose plus prononcé sur les bactéries à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif (254). Les nanoargents sont aussi connus pour leur effet virucide ou/et d'inhibition de l'entrée des virus dans la cellule d'hôte. Leur efficacité antivirale a été étudiée sur les virus HIV-1 ; ces effets virucides ont été observés à la fois sur des virus isolés et associés aux cellules infectées à dose non-cytotoxique. Cette étude ouvre la voie à une nouvelle application des nanoparticules dans la lutte contre les infections virales pour lesquels les vaccins n'existent pas encore.

▪ **Nanoparticules d'oxydes métalliques**

Les oxydes métalliques représentent une nouvelle classe de matériaux importants pour la recherche fondamentale et les applications médicales grâce à la diversité de leurs propriétés physiques et chimiques et à leurs effets antibactériens. Les nanoparticules d'oxydes métalliques peuvent être synthétisées selon différents procédés (255).

Une des premières études illustrant l'effet bactéricide de nano-oxyde de magnésium est celle de l'équipe de Klabunde (256), qui a porté sur des MgO préparés par la procédure

d'aérogel des halogènes. Ils ont montré que les nanocristaux de MgO avec les halogènes absorbés exhibaient une forte activité bactéricide car, après dispersion de ces nanoparticules sur des surfaces contaminées par *E. coli*, la totale stérilisation a été obtenue en moins de 20 minutes. Quelques années plus tard, les effets antibactériens de l'oxyde de magnésium de tailles différentes (23-8 nm) ont été rapportés pour *E. coli* (bactéries à Gram négatif) et *S. aureus* (bactéries à Gram positif). Cette étude a confirmé que les plus petites nanoparticules, de 8 nm de diamètre, sont les plus efficaces pour inhiber la croissance bactérienne.

Les progrès scientifiques dans le domaine des nanomatériaux sont à l'origine de nouvelles questions sur les risques éventuels engendrés en matière de santé, d'environnement et de sécurité. Les nanoparticules ont fait et font encore l'objet d'études expérimentales et épidémiologiques notamment en ce qui concerne leurs effets nocifs. Certaines nanoparticules ont la propriété de réagir ou d'adsorber à leur surface des molécules qui peuvent être toxiques. Dans ce cas, les nanoparticules deviennent toxiques à cause des molécules véhiculées qui peuvent ainsi pénétrer plus facilement dans les organes (245).

V-1-2) Les peptides antimicrobiens

▪ Généralités

Les peptides antimicrobiens PAMs (AMP pour antimicrobial peptides) sont abondants dans la nature et tous les organismes vivants: champignons, plantes, oiseaux mammifères, crustacés, amphibiens et bactéries (257-259). Les PAMs ont été découverts à l'origine en raison de leur rôle dans l'élimination des bactéries (260, 261), et ils sont libérés en réponse à une infection bactérienne (260, 262). Ce sont des peptides multifonctionnels qui représentent des agents de défense contre un large spectre de pathogènes (263, 264). En effet ils présentent des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires et anticancéreuses (265). De plus, par rapport aux antibiotiques courants, ils développent moins de résistance chez les agents pathogènes compte tenu de leur rapidité à les neutraliser (264). Ces facteurs font en sorte que le domaine de la recherche sur les PAMs a pris énormément d'ampleur et le nombre de peptides naturels identifiés ne cesse d'augmenter (266).

Les peptides antimicrobiens comportent en moyenne entre 20 et 50 acides aminés, dépassant rarement 5 kDa (267). La présence de résidus d'acides aminés arginine et lysine chargés positivement confère aux PAMs une charge nette positive de valeur variant généralement entre +2 et +9. Ils possèdent également jusqu'à 50% d'acides aminés

hydrophobes (268). Les peptides antimicrobiens adoptent une structure amphiphile en présence d'une membrane. Ce caractère ainsi que les charges positives seraient en grande partie responsables de leur activité antimicrobienne (269).

▪ **La classification des peptides antimicrobiens**

Plusieurs classifications ont été établies, en suivant l'évolution des découvertes. Ils ont tout d'abord été classés en fonction de leur origine. Les tous premiers peptides découverts portent ainsi le nom de l'être vivant dont ils sont issus : chez les bactéries, on les a nommés bactériocines (270). Actuellement, la classification consensuelle des PAMs repose sur leur charge globale et la diversité structurale (secondaire et tertiaire, la présence ou non de ponts disulfure) (260, 271, 272). Les PAMs peuvent être classés en cinq principaux groupes : les peptides formant une hélice- α , les peptides riches en résidus cystéines, les peptides formant un feuillet- β , les peptides riches en acides aminés tels l'arginine et la proline et les peptides composés d'acides aminés rares et modifiés (cf. Table 5) (273).

▪ **Synthèse des peptides antimicrobiens (PAMs)**

Les PAMs sont des peptides endogènes synthétisés par l'organisme et définis par le code génétique. En 1999, Hancock et Chapple décrivent deux modes de synthèse des PAMs : la synthèse par voie ribosomale et la synthèse par voie non ribosomale (274).

Les PAMs synthétisés par voie ribosomale sont dits naturels. Ils sont synthétisés par toutes les espèces vivantes, stockés dans les granules de sécrétion des cellules et libérés sur le lieu d'infection lors d'une attaque de l'organisme (stress induit par des agents pathogènes par exemple). Ces protéines obtenues par synthèse ribosomale peuvent être de grandes tailles et servir de précurseurs pour la synthèse de peptides biologiquement actifs (275).

Les peptides obtenus par synthèse non ribosomale se retrouvent essentiellement chez les bactéries, les champignons les streptomycètes. Ce sont par exemple les gramicidines, les polymyxines, les bacitracines, et les glycopeptides (274).

Les PAMs subissent naturellement des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation (276) qui protègent les peptides de la dégradation enzymatique par les protéases microbiennes. Les PAMs peuvent être classés en fonction de leur composition en acides aminés et de leur structure (277). Le **tableau 3** regroupe quelques exemples de PAMs de chaque catégorie.

Tableau 3: Classification des peptides antimicrobiens en fonction de leurs structures.

Peptides cationiques linéaires à hélice α
<ul style="list-style-type: none"> • Cécropine A, andropine, moricine, cératoxine, mellitine (insectes) • Cécropine P1 (nématodes) • Magainine, dermaseptine, bombinine, brévinine-1, esculentine, buforine II (amphibiens) • Pleurocidine (sécrétions des muqueuses de la peau de plie rouge) • Séminalplasmine, BMAP, SMAP (SMAP 29, ovispirine), PMAP (bovin, ovin et porcin) • CAP 18 (lapin) • LL-37 (humain)
Peptides cationiques riches en certains acides aminés
<ul style="list-style-type: none"> • Peptides riches en proline : abaécine (abeilles) • Peptides riches en proline et en arginine : apidaécine (abeilles), drosocine (drosophile), pyrrocicine, (punaise, <i>Pyrrhocoris apterus</i>), bacténicines (bovin, ovin et chèvre), PR-39 (porcin) • Peptides riches en proline et en phénylalanine : prophénine (porcin) • Peptides riches en glycine : hyménotaécine (abeilles) • Peptides riches en proline et en glycine : coléoptéricine et holotricine (coléoptères) • Peptides riches en tryptophane : indolicidine (bovin) • Petits polypeptides salivaires riches en histidine : histatine (humain et certains grands primates)
Peptides contenant des cystéines et des ponts disulfures
<ul style="list-style-type: none"> • Peptides contenant 1 pont disulfure : brévinine • Peptides contenant 2 ponts disulfures : protégrine (porc), tacchylésine (limule) • Peptides contenant 3 ponts disulfures : défensine α (humain : HNP-1, HNP-2, cryptidine ; lapin : NP-1 ; rat), défensines β (Humain (HBD1, DEFB118), bovin, souris, rat, porcin, chèvre, volaille), défensine Θ (macaque rhésus (RTD-1)) • Défensines des insectes : défensine A • SPAG11/isoform HE2C (défensine β atypique) • Peptides qui contiennent plus de 3 ponts disulfures : drosomycine (drosophiles), défensines antifongiques des plantes
Peptides dérivés de protéines plus grandes
<ul style="list-style-type: none"> • Lactoferricine, dérivée de la lactoferrine • Casocidine, dérivée d'une caséine humaine • Domaines antimicrobiens de la lactalbumine bovine, hémoglobine humaine, lysozyme, lactotransferrine et ovalbumine
Peptides anioniques
<ul style="list-style-type: none"> • Maximime H5 (amphibiens) • Petits peptides anioniques riches en acide glutamique et en acide aspartique (ovin, bovin et humain) • Dermicidine (humain)

▪ **Les peptides antimicrobiens cationiques**

Les PAMs cationiques linéaires regroupent la majorité des peptides sans pont disulfure recensé. Ce sont des peptides linéaires qui peuvent être structurés en forme de pelote déroulée (278). Dans ce groupe, on peut distinguer les peptides cationiques linéaires à hélice- α et les peptides cationiques riches en certains acides aminés. Les peptides cationiques comprennent

également un grand nombre de peptides riches en certains acides aminés comme la proline ou d'autres acides aminés tels que l'arginine, la phénylalanine, la glycine (279). Ils peuvent également être riches en tryptophane (280). L'arginine, la lysine ou l'histidine leur confèrent leur charge positive qui varie de +2 à +9. Cette charge leur permet d'interagir avec le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif.

▪ **Les peptides antimicrobiens contenant des cystéines et des ponts disulfures**

Les PAMs riches en résidus cystéines sont des peptides cycliques possédant plusieurs feuilletts β antiparallèles stabilisés par les ponts disulfures s'établissant entre les résidus de cystéine. Ces peptides cationiques peuvent contenir entre 2 et 8 cystéines qui s'apparient pour former des structures de type "épingle à cheveux". Les principaux représentants de cette classe de peptides sont les défensines (281).

▪ **Les PAMs dérivés de grandes protéines**

Les PAMs générés à partir de grandes protéines sont obtenus par protéolyse. C'est le cas de tous les peptides dérivés des granines (282), ou encore des peptides dérivés de la lactoferrine (283), des protéines du complément et de l'ubiquitine (284).

▪ **Les PAMs anioniques**

Ce sont des peptides souvent riches en acides aspartique et glutamique. Le mode d'action de ces peptides n'est pas aussi bien connu que celui des PAMs cationiques, mais des études suggèrent qu'ils agissent par l'intermédiaire d'une structure d'orientation oblique de leur forme hélicoïdale (285) ou d'une distribution asymétrique de l'hydrophobicité le long de l'axe de l'hélice α permettant la pénétration du peptide dans la membrane des pathogènes par un angle faible et qu'ils ont besoin d'un cofacteur comme le zinc pour agir (286).

▪ **La structure des PAMs**

La nature des acides aminés constituant la chaîne peptidique est importante pour déterminer le caractère anionique ou cationique du peptide ainsi que pour son activité. Des études ont montré que le changement d'un acide aminé dans une chaîne peut modifier l'activité du peptide. La structure secondaire induit une répartition favorable des charges ce qui permet de comprendre le mode d'action d'un peptide. Quatre types de structures

secondaires sont essentiellement décrits pour les PAMs : l'hélice α , le feuillet β , le coude et la pelote déroulée (287).

▪ **Les activités biologiques des peptides antimicrobiens**

De nombreuses études ont porté sur l'implication des PAMs dans la défense des organismes. Les PAMs peuvent agir directement sur les bactéries, les virus, les champignons, les cellules tumorales, afin de les éliminer ou moduler la réponse en recrutant et en activant les cellules immunitaires (288). Ils interviennent également dans diverses pathologies.

Leur spectre d'action est si vaste qu'un nouveau terme se développe, celui de HDP, *Host Defense Peptides*, pour remplacer le terme plus restrictif de PAMs car ils sont impliqués dans plusieurs mécanismes de défense de l'hôte (289, 290). La **figure 26** résume la quasi-totalité des activités de défense portées par les PAMs (290).

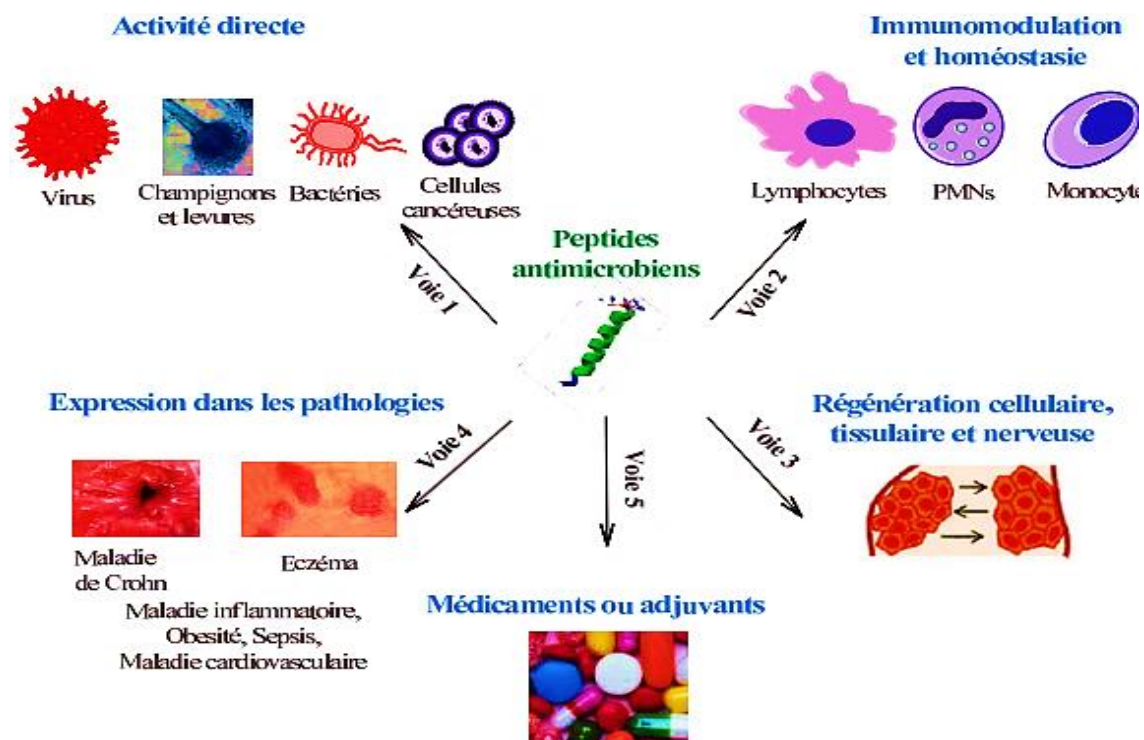


Figure 26: Les différentes voies des activités de défenses portées par des peptides antimicrobiens : régénération cellulaire, immun modulation des cellules lymphatiques, expression dans des pathologies, activité sur des médicaments et autres activités directes (290).

▪ **Activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne est la mieux étudiée pour les PAMs. Les PAMs possèdent souvent un large spectre d'activité et de mécanismes d'action. Cette activité résulte

principalement de l'interaction des peptides avec la membrane des pathogènes. Il faut souligner que l'activité des PAMs peut être modifiée en présence de NaCl, de carbonates ou de chlorures ([270](#)).

▪ **Activité anti-cancéreuse**

Certains PAMs interviennent sur les cellules tumorales de deux manières : soit en agissant sur les cellules cancéreuses, soit en agissant sur les cellules normales et les cellules cancéreuses. La toxicité sélective des PAMs pour les cellules cancéreuses peut s'expliquer par le fait que les cellules cancéreuses sont chargées négativement à cause de la présence de molécules anioniques comme la phosphatidylsérine ([291](#), [292](#)), ou de mucines O-glycosylées riches en saccharides chargés négativement ([293](#)). Les cellules cancéreuses ont une surface plus grande que les cellules normales, ce qui leur permet d'interagir avec une quantité plus importante de peptides que les cellules normales ([294](#)).

▪ **Activité antivirale**

L'activité antivirale des PAM se fait par adsorption sur le virus ou par une activité directe sur l'enveloppe du virus. L'activité antivirale dépend beaucoup du PAM considéré. Par exemple, les peptides en hélice α comme les cécropines, les clavanins ou la cathélicidine LL-37 ont une activité minime voire nulle sur l'inactivation du virus Herpes simplex (HSV). Des études antérieures ont montré que les virus à ARN enveloppé et à ADN peuvent être ciblés par les PAMs antiviraux ([295](#)). Il existe plusieurs hypothèses sur les mécanismes d'action des PAM pour leur activité antivirale. Les PAMs peuvent s'intégrer dans les enveloppes virales et provoquer une instabilité de la membrane, rendant les virus incapables d'infecter les cellules hôtes ([296](#)). Les PAMs peuvent également réduire la liaison des virus aux cellules hôtes ([297](#)). Outre la perturbation des enveloppes virales et le blocage des récepteurs viraux, certains PAMs antiviraux peuvent empêcher les particules virales de pénétrer dans les cellules hôtes en occupant des récepteurs spécifiques sur les cellules de mammifères ([298](#)). Par exemple, l'héparane sulfate est important pour la fixation des particules virales du VHS à la surface de la cellule hôte.

➤ **Mode d'action des peptides antiviraux**

Il existe plusieurs hypothèses sur les mécanismes d'action des PAM pour leur activité antivirale. Nous allons décrire brièvement les plus marquantes dans les paragraphes suivants.

a. Blocage de l'entrée du virus

Tout d'abord, l'entrée du virus dans la cellule peut être bloquée par une interaction avec l'héparane sulfate (ou sulfate d'héparane). Ces glycosaminoglycanes (GAG) ou plus précisément ces protéoglycanes sont des molécules polysaccharidiques retrouvées dans de nombreux types de tissus, dans la matrice extracellulaire mais également à la surface des cellules. L'héparane sulfate est l'un des composés les plus anioniques présent à la surface des cellules mammifères. Cette charge négative lui permet de se lier aux petits cations, aux protéines, lipoprotéines mais aussi à certains virus. Ainsi, bloquer de l'héparane sulfate peut réduire l'infectivité. Les charges positives des PAM interagissent avec les charges négatives de l'héparane sulfate situé à la surface des cellules, les « protégeant » ainsi d'une invasion par un virus. Ainsi, il a été notamment montré que la lactoferricine est capable de bloquer une infection par HSV, et que ce PAM a également une activité antivirale contre le CMV, le Papillomavirus, ainsi que le VIH ([299](#), [300](#)).

De plus, les PAM pourraient interagir directement avec les récepteurs spécifiques de la cellule hôte pour le virus. Le PAM se lierait au récepteur en question, empêchant la fixation du virus à la cellule, bloquant donc son entrée.

b. Blocage de la propagation du virus

Les PAM antiviraux sont capables de bloquer la propagation du virus d'une cellule à une cellule voisine par des « tight junctions ». C'est notamment le cas pour les peptides en hélice α concernant la propagation du HSV, ainsi que la lactoferricine bovine ([300](#))

c. L'interaction directe avec l'enveloppe virale.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les PAM antibactériens, les PAM sont capables d'interagir avec les membranes lipidiques, entraînant leur déstabilisation et la formation de pores. Il est donc vraisemblable que l'enveloppe des virus soit une cible potentielle pour une interaction directe, dont le médiateur cellulaire n'a pas encore été identifié. Ainsi, la dermaseptine et l'indolicidine ont démontré qu'elles exercent une activité anti-VIH avant l'entrée du virus dans la cellule, grâce à une interaction directe avec la particule virale ([300](#)).

d. Les cibles intracellulaires

Il est probable que lors de la réplication du virus dans la cellule, les PAM présents seraient en mesure de bloquer l'expression des gènes viraux, ou la synthèse de protéines virales ou encore d'activer des mécanismes antiviraux de la cellule hôte (300).

▪ **Activité antifongique**

Comme les PAMs antibactériens, les peptides antifongiques peuvent tuer les champignons en ciblant la paroi cellulaire (301) ou les composants intracellulaires (302). Cependant, la membrane bactérienne et la paroi cellulaire des champignons ont des contenus différents. Par exemple, la chitine est l'un des composants majeurs des parois cellulaires fongiques et certains peptides antifongiques sont capables de se lier à la chitine (303).

▪ **Activité antiparasitaire**

Les peptides antiparasitaires forment un groupe plus petit que les quatre autres classes d'PAMs. Le premier peptide antiparasitaire rapporté est la magainine, capable de tuer *Paramecium caudatum* (304). Plus tard, un peptide synthétique a été développé contre le parasite *Leishmania* (305). Même si certains microorganismes parasites sont multicellulaires, le mode d'action des peptides antiparasitaires est le même que celui des autres AMPs. Ils tuent les cellules en interagissant directement avec la membrane cellulaire (306).

▪ **La résistance des microorganismes aux PAMs**

Les microorganismes développent également des résistances contre les PAMs. Même si ces résistances sont moindres et moins connues que celles aux antibiotiques, il est important de ne pas les ignorer afin de prévenir l'apparition de nouvelles souches microbiennes résistantes (307). Ces résistances sont induites en premier lieu, parce que les microorganismes d'une niche écologique donnée, sont capables de résister à des concentrations élevées de peptides endogènes (308). D'autres causes peuvent engendrer des résistances aux PAMs. Quatre types de mécanismes se dégagent essentiellement (309) (**Figure 27**).

- La dégradation protéolytique : Les bactéries produisent des protéases qui vont dégrader les PAMs actifs en peptides inactifs.
- Les mécanismes de piégeage : Certains pathogènes sont capables de reconnaître les PAMs et d'inhiber leur action en limitant leur accès à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de molécules de piégeage.

- Le transport actif utilisant les pompes à efflux : les pompes à efflux sont des protéines membranaires retrouvées dans la membrane de certaines bactéries. Ces pompes participent au transport actif vers l'extérieur de la cellule et sont alimentées en énergie par l'ATP. Elles sont capables d'expulser le peptide de la cellule ([310](#)).
- Les modifications des propriétés membranaires (charge du peptide ou de la membrane et modifications des récepteurs-cibles). Les variations de séquences d'acides aminés lorsqu'elles touchent des acides aminés importants par leur caractère cationique ou amphipathique altèrent l'activité du peptide ([309](#)).

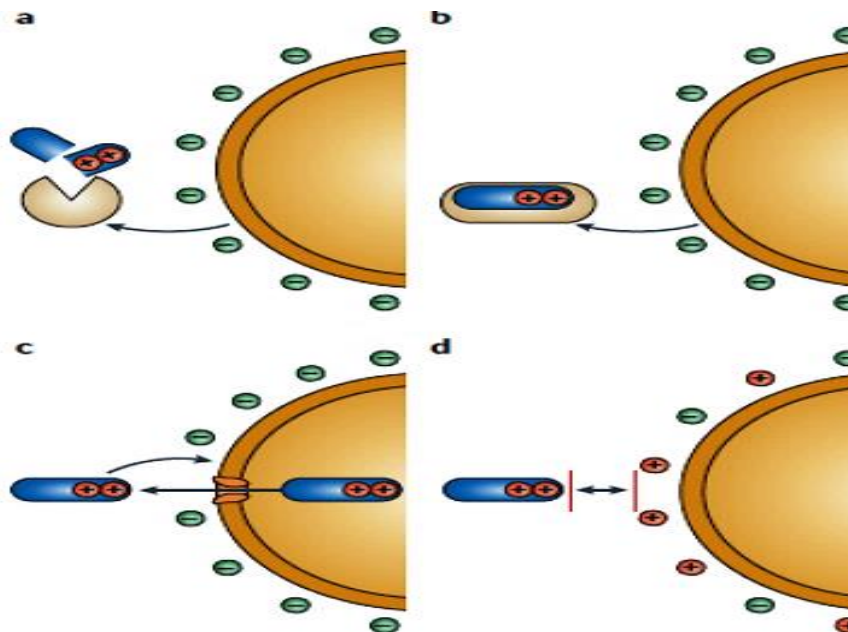


Figure 27 : Mécanismes de résistance des bactéries aux PAMs. a) La dégradation protéolytique ; b) Les mécanismes de piégeage du peptide ; c) Le transport actif utilisant les pompes à efflux ; d) altérations de la charge du peptide ou de la membrane des microorganismes([309](#)).

V-1-3) Les bactériocines

▪ Définition

Il existe plusieurs définitions du terme bactériocine. A l'origine, ce terme a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique chez les bactéries. Plus précisément, les bactériocines sont des peptides avec une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice. Elles représentent une large gamme de peptides qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'activité et de leur mode d'action ([311](#)).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traditionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (312, 313). Cependant, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus*, *Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines (314). L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (312).

- **Bactériocines produites par les bactéries lactiques**

- **Généralités**

La première découverte des bactériocines a été signalée il y a presque un siècle, lorsque Gratia (1925) a démontré l'inhibition de souches *d'E. coli* S par une substance thermostable provenant d'une culture *d'E. coli* V. Ces substances inhibitrices ont été appelées colicines en référence à l'espèce productrice (315). L'inhibition de la croissance de différentes bactéries lactiques par un métabolite produit par *Streptococcus lactis*, aujourd'hui classifié comme *Lactococcus lactis* (316) est à la base de la découverte de la première bactériocine produite par une bactérie lactique, en 1928 (317). Celle-ci a été décrite par Whitehead cinq ans plus tard et en 1947, elle a été nommée nisine (318). En 1951, d'autres travaux ont prouvé qu'au cours de l'affinage d'un fromage, les clostridies étaient inhibées par la nisine (319). Selon Klaenhammer (1988) (311) et Margaret & John (2002), 99% des espèces bactériennes peuvent produire au moins une bactériocine. Les bactériocines se caractérisent par leur très grande diversité, que ce soit au niveau de leur structure, de leur mode d'action ou de leur spectre d'action (312).

La famille des bactériocines est très diverse, deux grands groupes peuvent être différenciés. D'une part, les bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif, principalement représentées par les colicines et les microcines. Leur masse moléculaire est inférieure à 10 kDa et sont synthétisées par la voie ribosomale. La production de ces peptides est généralement induite lorsqu'une carence en nutriments est détectée dans le milieu. Ils sont en général plutôt thermostables, résistantes aux pH extrêmes ainsi qu'à la dégradation par les

protéases (320-323). Elles servent comme système modèle pour des études sur les bactériocines, telles que les relations structure-fonction (324). De nombreux travaux ont porté sur les microcines, produites par des souches d'entérobactéries, du fait de leurs applications thérapeutiques potentielles.

D'autre part, les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont les plus abondantes (325) et sont les plus étudiées, en raison de leur statut GRAS « *Generally Recognized As Safe* » (326). Ces bactériocines sont généralement de faible masse moléculaire (rarement plus de 10 kDa) (326, 327).

Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques, mais peuvent, en revanche, être une alternative viable aux antibiotiques (328). La différence majeure entre les antibiotiques et les bactériocines est que ces dernières sont synthétisées par voie ribosomique et produites au cours de la phase primaire de la croissance alors que les antibiotiques sont, en majorité, des métabolites secondaires (326). En outre, les bactériocines ont des spectres d'activité relativement étroits comparés à ceux constatés chez les antibiotiques (325, 326).

▪ Mécanisme d'action

Le mode d'action diffère d'une bactériocine à une autre. Par contre, le mécanisme d'action des bactériocines se décompose en trois étapes : la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible (durant cette étape le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle lui permettant d'exprimer son activité) ; l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique avec recrutement de plusieurs peptides antibactériens pour former un pore et enfin, la formation de pores conduisant aux fuites de composés intracellulaires vitaux (**Figure 28**). Cette perte entraîne des effets néfastes pour la cellule cible, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire (329).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, agissent en général par le même mécanisme d'action, en perturbant le fonctionnement de la membrane cytoplasmique (330, 331). C'est le mode d'action le plus répandu, surtout chez les bactériocines de la classe II. La première étape est une interaction initiale de la bactériocine avec des récepteurs cellulaires spécifiques (reconnaissance d'une cible), c'est le cas notamment de la mersacidine (332) et de la nisine (333) ou non spécifiques (interactions électrostatiques ou hydrophobes) (277).

Les bactériocines vont par la suite s'adsorber sur la membrane cytoplasmique et la perméabiliser par formation de pores conduisant à la mort de la cellule cible (277, 334, 335). Ainsi, l'action de la bactériocine se traduit, d'une part par l'augmentation de la perméabilité membranaire, provoquant un déséquilibre ionique et une fuite de phosphate inorganique (335, 336) et d'autre part par une perte de la Force Proton Motrice (FPM) qui implique la dissipation totale du potentiel transmembranaire et du gradient de pH (335, 337). Cette FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne.

D'autres bactériocines ont un autre mode d'action : la perturbation du fonctionnement de la cellule. Koo et al. (2001) ont montré que la perméabilisation seule de la membrane de *S. aureus* par la gramicidine D et la protamine ne conduisait pas à la mort de la cellule. Différentes cibles peuvent être attaquées, ce qui contribue à perturber le fonctionnement cellulaire. L'épidermine, la mersacidine, ainsi que la nisine (332) se lient au lipide II et inhibent la transglycosylation, étape clé de la biosynthèse de la paroi bactérienne (332). D'autres peptides antimicrobiens peuvent inhiber la synthèse des acides nucléiques, comme la pleurocidine et la dermaseptine S1 (338) ou inhiber la synthèse protéique ou encore inhiber certaines fonctions enzymatiques (277).

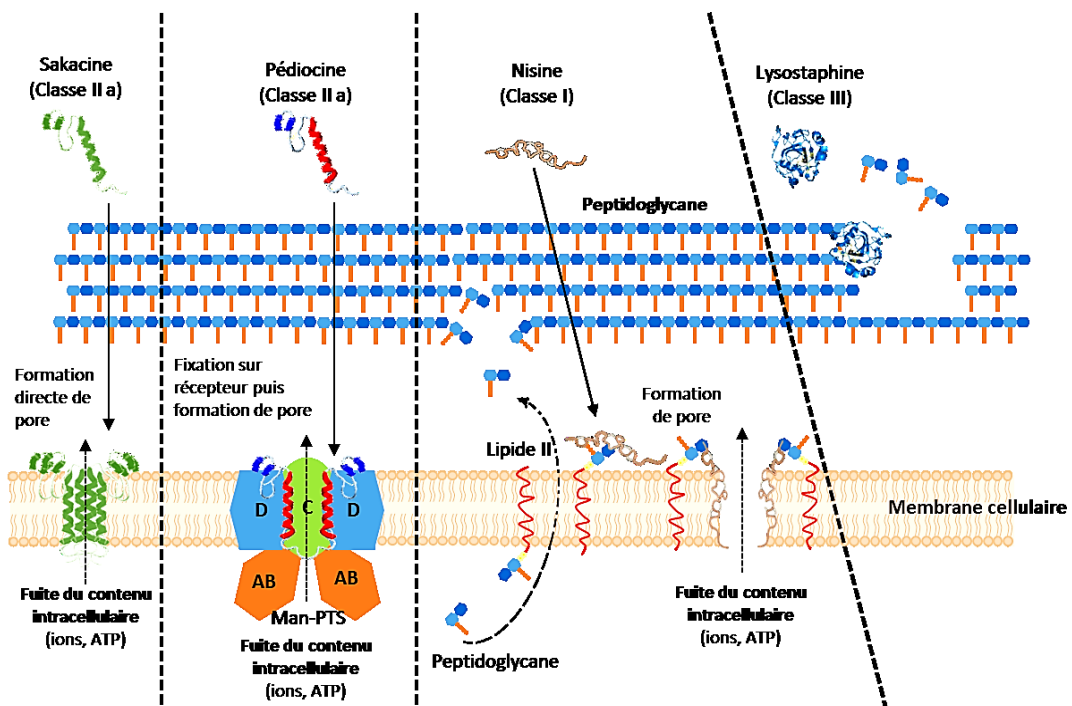


Figure 28 : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif. Schéma proposé par Fernandez (2014) (339) et repris ici sans modifications.

La sakacine, une bactériocine de classe IIa, agit directement au niveau de la membrane interne en formant un pore conduisant à la mort de la bactérie cible. La pédiocine PA-1, appartenant aussi à la classe IIa, se fixe sur l'unité D du mannose phosphotransférase (enzyme transmembranaire multimérique). Elle s'internalise et force le canal à rester ouvert, conduisant à la fuite du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie cible. Enfin, la lysostaphine, une bactériocine de classe III agit directement au niveau du peptidoglycane (339).

V-1-4) Les plantes médicinales

▪ Généralités

La phytothérapie, du grec *phyton* pour plante et *therapein* pour soigner, est l'utilisation des plantes médicinales en thérapeutique. Selon l'O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé) la phytothérapie est considérée comme une médecine alternative.

Aujourd'hui, face à l'émergence de nouvelles maladies infectieuses et neurologiques et de nombreuses souches résistantes de pathogènes, les plantes médicinales constituent une alternative non négligeable. Ainsi, de plus en plus de scientifiques s'intéressent aux plantes et tentent d'en isoler les principes actifs. Une citation de Galien dit : « la meilleure médecine, c'est la nature car elle guérit les trois quarts de toutes les maladies ».

Les propriétés médicinales des plantes, dues à leur composition chimique, peuvent s'expliquer par le fait que les plantes synthétisent des métabolites primaires (protéines, lipides, hydrate de carbone) pour leurs substances et celles des organismes qui s'en nourrissent ainsi que des métabolites secondaires destinés à les protéger contre les agressions causées par les champignons, les bactéries, les animaux ou d'autres plantes. C'est dans ce second groupe de métabolites que sont retrouvées les molécules actives (340).

Plusieurs arguments plaident pour l'usage des plantes médicinales : leur faible coût, la résistance accrue des pathogènes aux antibiotiques classiques, les limites de la médecine moderne, la richesse médicinale des plantes. L'activité de la plante (et donc son champ d'action et son efficacité) est très variable d'une préparation à l'autre.

▪ Les grandes familles de principes actifs

Les principes actifs des plantes dérivent de leur métabolisme primaire et de leur métabolisme secondaire (**Figure 29**).

Le métabolisme primaire aboutit à la synthèse de molécules indispensables à la plante telles que les sucres, les protéines, les lipides, les vitamines, les macroéléments et les oligoéléments. C'est dans ce groupe que sont en général tirés les compléments alimentaires et les aliments.

Le métabolisme secondaire permet la production de molécules nécessaires à la plante de s'adapter à son biotope. On y retrouve des molécules appartenant aux familles des alcaloïdes, des polyphénols, des saponosides, des coumarines, des stéroïdes, des terpènes. Ces molécules sont souvent responsables des propriétés médicinales des plantes.

Ces molécules ont souvent des activités biologiques bénéfiques, mais il existe aussi dans les plantes beaucoup de molécules toxiques ou dont la toxicité est liée à la dose. Les principes actifs des plantes et les activités qui leur sont associées sont bien décrits et classés ci-après ([341](#), [342](#)).

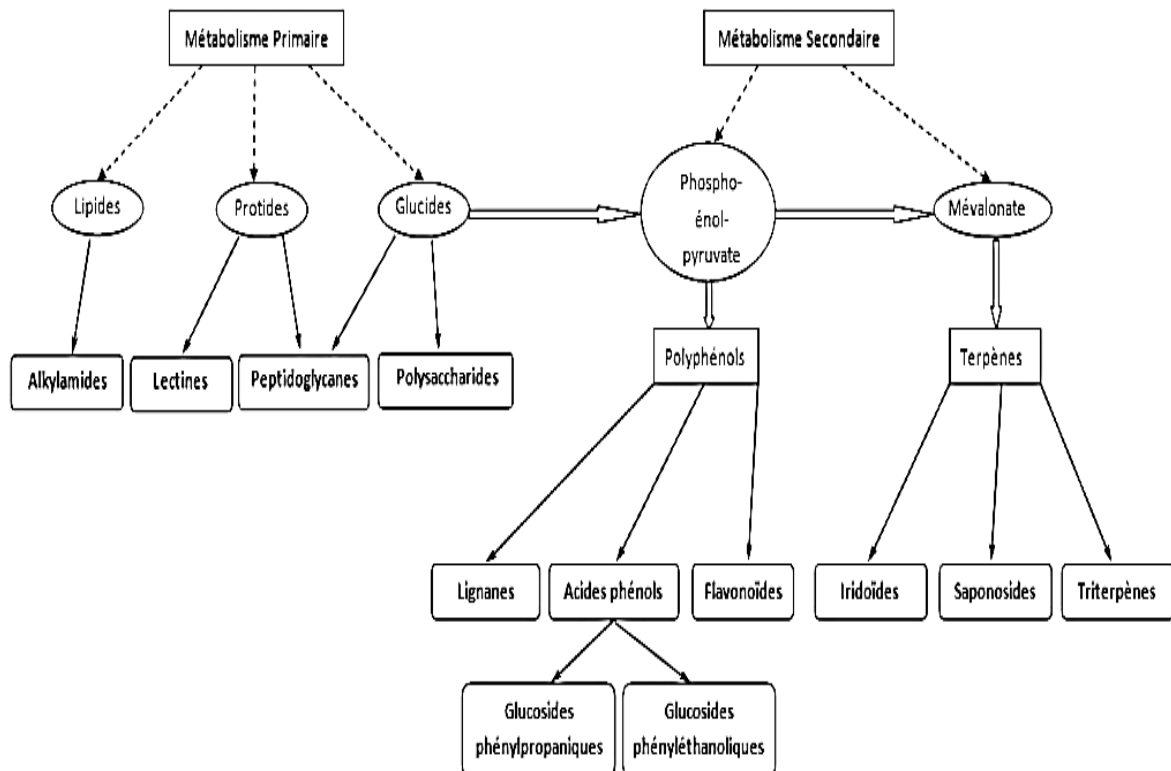


Figure 29 : Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie : certains principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires ([343](#)).

- Les sucres et glucides.
- Les polysaccharides.
- Les graisses, les lipides, les huiles, les acides gras et autres.
- Les acides aminés et les protéines.
- Les minéraux
- Les alcaloïdes : Ce sont des molécules basiques (alcalines) et azotées. Il s'agit par exemple de la morphine et de la cocaïne. Ces substances sont toxiques à des faibles doses.
- Les mucilages : Ce sont des polysaccharides, protecteurs des surfaces (muqueuses). Un exemple est la guimauve.
- Les saponosides : Substances qui modifient la tension superficielle de l'eau et la font mousser (comme le savon), ce qui permet la pénétration de substances à travers la peau. Elles seraient aussi vasoconstrictrices et anti-inflammatoires.
- Les anthocyanes et les flavonoïdes : Ce sont les pigments (bleu, violet, jaune, orange, rouge...) qui donnent leurs couleurs aux pétales de fleurs.
- Les coumarines : Dérivés phénoliques à noyau benzo-alpha-pyrone. Elles agiraient dans la protection des vaisseaux.
- Les lactones sesquiterpéniques : Elles auraient une activité antibactérienne.
- Les vitamines : Ces sont des substances organiques nécessaires aux métabolismes. L'homme est incapable de les synthétiser donc elles doivent lui être apportées par l'alimentation.
- Les huiles essentielles : On les trouve dans les plantes dites aromatiques.

- **Traitement des maladies infectieuses**

Les plantes contiennent un très grand nombre de molécules pouvant avoir des modes d'action pharmacologiques variés voire synergiques vis-à-vis des bactéries ou de l'animal infecté, en prévention ou en traitement des maladies d'étiologie bactérienne ([344](#)).

Chez les bactéries, l'activité peut être antibactérienne ou réduire la virulence des bactéries en perturbant, par exemple, la communication bactérienne ou la formation de biofilms. A titre d'exemple, les polysaccharides : grâce à leurs propriétés anti-adhésives, les polysaccharides se fixent sur les structures galactosyl des sites d'adhésion des bactéries et de fusion virale. Ils empêchent ainsi l'adhésion des organismes pathogènes ([345](#)).

Chez l'animal, les propriétés des plantes peuvent être anti-inflammatoires, immunomodulatrices ou physiologiques, réduisant les signes cliniques de l'infection tout en aidant aux processus de guérison. À titre d'exemple dans le cadre de maladies infectieuses, certaines plantes comme l'eucalyptus, le fenouil, la muscade ont des effets antibiotiques. D'autres contiennent des tannins qui ont un effet préventif ou curatif pour les diarrhées, par exemple l'épicéa ou le chêne (344). Le **tableau 4** présente l'action de certains extraits de plantes médicinales.

Tableau 4 : Propriété des extraits de plantes médicinales (346).

	Eucalyptus	<i>Malaleuca altemifolia</i>	Uncaria	Curcuma	Gingembre
Anti-Inflammatoire	×	×	×	×	×
Antiseptique	×	×		×	
Antivirale	×	×	×		×
Antibactérienne	×	×		×	×
Antifongique		×		×	
Expectorant	×	×			
Stimulant de l'immunité			×		×
Antioxydantes			En association		×

▪ **Mécanismes d'actions**

Selon la plante considérée, des différents mécanismes d'action ont observées (346).

- **Stimulation de l'activité sécrétoire** et notamment la production d'enzymes digestives favorisant une meilleure digestion et valorisation alimentaire.
- **Lutte contre l'inflammation** en inhibant le transmetteur permettant la libération de cytokines pro-inflammatoires (protéines de l'inflammation). L'intégrité de la barrière intestinale est ainsi conservée.
- **Élimination des effets toxiques** et des pathogènes.
- **Lutte contre le stress oxydatif** en stimulant l'élimination des radicaux libres.
- **Stimulation de l'immunité** par la voie humorale.
- **Relance du cycle hormonal** en favorisant l'arrêt de la sécrétion de lait.

- **Action contre les protozoaires** grâce à certains phytoconstituants (ex : saponines).

V-1-5) Les huiles essentielles (HE)

- **Généralités**

Les huiles essentielles ont un très large spectre d'inhibition comprenant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (243), des champignons (347, 348) et des virus à ADN et à ARN (349). Le mode d'action de ces huiles essentielles n'est que partiellement étudié : plusieurs molécules phénoliques telles que le xylénol, le crésol et le carvacrol exercent une activité bactéricide en provoquant des altérations des membranes bactériennes et la perte des métabolites intracellulaires (350).

- **Définition**

Une huile essentielle est définie comme le produit obtenu d'une plante ou certaines parties de celle-ci par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage (351). Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau. Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (352, 353). Les huiles essentielles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante néanmoins, elles confèrent les caractéristiques par lesquelles les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques (354).

- **Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles (HE)**

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de saffran. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (355).

- **Les composants chimiques des HE**

La composition chimique d'une HE est complexe, on y retrouve couramment plus d'une centaine de composés, parmi lesquels nombre de familles chimiques sont représentées ([356](#), [357](#)).

- **Les terpènes** : Ce sont des molécules composées d'un nombre variable d'unités d'isoprène, comptant les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes, Ex : α -pinène.
- **Les alcools** : Les alcools ont généralement des propriétés antiseptiques, antivirales. Ils présentent généralement peu ou pas de toxicité (le menthol faisant exception à cette règle). Exemple : le menthol, le linalol.
- **Les phénols** : Ce sont de puissants antibiotiques, à large spectre d'action, ainsi que de bons virucides et antifongiques. Ex : le carvacrol, le thymol, l'eugénol.
- **Les phénols méthyl-éthers** : La structure phénolée subit une méthylation, faisant perdre à ces molécules la dermocausticité des phénols, et leur faisant acquérir de nouvelles propriétés : antispasmodiques puissants des muscles lisses, certains sont aussi antiallergiques (chavicol méthyl-éther), ou antalgiques cutanés (eugénol méthyl-éther). En ce qui concerne les propriétés antibiotiques, elles ne doivent pas être utilisées sans aromatogramme.
- **Les aldéhydes** : Ils ont des propriétés calmantes et anti-inflammatoires. Certains sont antiviraux (géraniol).
- **Les esters** : Ils sont négativants, spasmolytiques, anti-convulsivants, anti-inflammatoires. Ils ne manifestent pas de toxicité aux doses thérapeutiques.
- **Les cétones** : Ce sont des molécules très actives, dont les propriétés s'inversent en fonction de la dose employée : à faible dose elles sont stimulantes du système nerveux central, tachycardisantes, et à doses plus élevées elles sont calmantes voire entraînant un état de stupéfaction.
- **Les lactones** : Elles sont mucolytiques et expectorantes, et présentent des propriétés antibactériennes et parasitocides (l' α -santonine est ascaricide et nématocide).
- **Les coumarines** : Ce sont de puissants sédatifs nerveux, anticonvulsivantes, elles sont hypotensives et anticoagulantes.
- **Les composés soufrés** : Relativement rares dans les HE, ce sont en général des anti-infectieux efficaces, mais ils sont fortement dermocaustiques, et leur emploi est délicat.

▪ **L'aromathérapie**

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE à des fins thérapeutiques, préventives ou curatives. Celles-ci sont utilisées soit par voie interne ou cutanée, soit par inhalation. Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages sur l'aromathérapie (358).

▪ **Pouvoir antimicrobien des HE**

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (359). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes. Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (8, 9). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (9).

▪ **Mode d'action des HE**

Les HE sont des molécules à caractère lipophile, ce qui leur permet de se répartir dans les lipides des membranes cellulaires bactériennes, et de les désorganiser, augmentant de ce fait leur perméabilité (360). L'action est légèrement différente pour les bactéries à Gram négatif : les composés hydrophobes des HE sont capables de gagner leur périplasme directement par les porines (361). On observe alors chez la bactérie une perte plus importante d'électrolytes comme le potassium et le sodium, ainsi qu'une sensibilité accrue aux changements de pH du milieu de culture (362). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**Figure 30**).

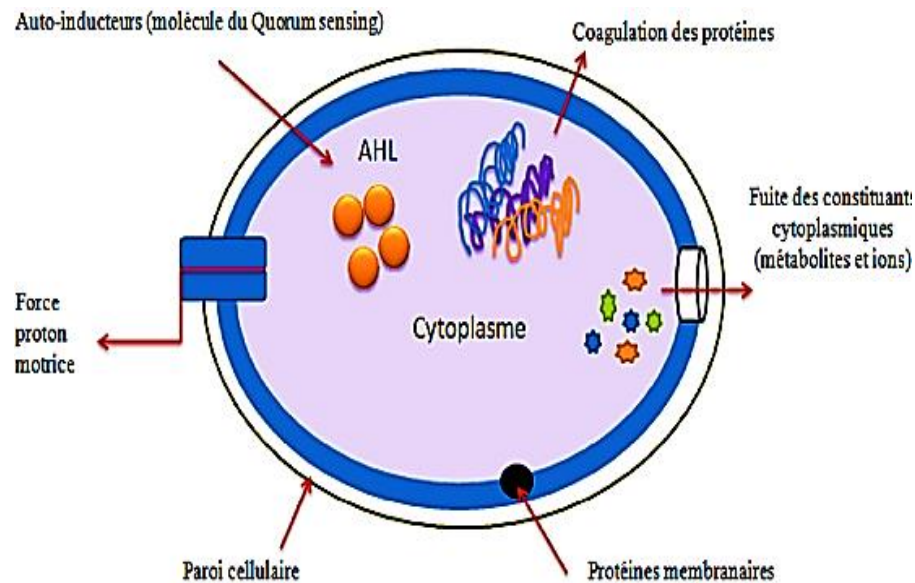


Figure 30 : Mécanisme d’action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (9, 363).

Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire. Le mode d’action de carvacrol et de thymol semblent capables d’augmenter la perméabilité membranaire (362). En détruisant la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (361). L’action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (364). Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu’il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir traversé la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires.

Des cellules d’*E. coli*, K12 exposées à des huiles essentielles ont été observées en microscopie électronique à balayage (365). Le thymol entraîne une diminution de la taille des bactéries, moyen probablement employé pour survivre. L’HE de girofle et d’origan induisent des changements morphologiques à la surface des bactéries qui sont absents chez les bactéries non traitées, L’eugénol provoque la libération de petites vésicules dans le milieu extérieur (Figure 31 A, 31 B, 31 C, 31 D, et 31 E). (365).

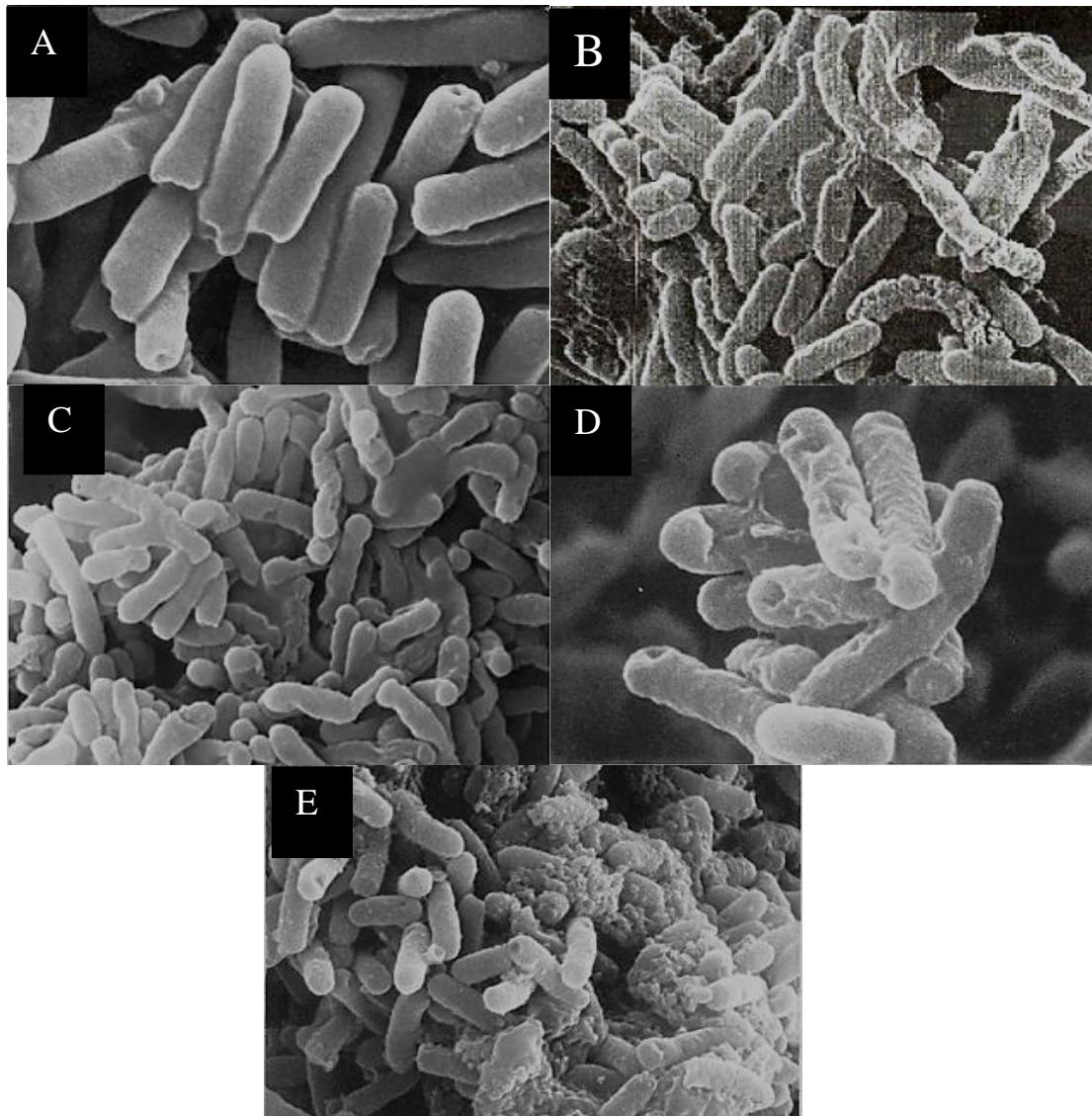


Figure 31 : Microscopie électronique à balayage (MEB) d'*E. coli* K12: A : *E. coli* non traitée ; B : *E. coli* traitée par l'HE d'origan ; C: *E. coli* traitée par le thymol ; D : *E. coli* traitée par l'HE de girofle ; E : *E. coli* traitée par l'eugénol ([365](#)).

Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

V-1-6) Les Acides organiques

Les acides organiques sont des composés organiques ayant des propriétés acides. Ces derniers sont produits, entre autres, par des bactéries ou des levures. L'acide lactique, l'acide formique, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide sorbique et l'acide propionique sont quelques exemples d'acides organiques ([244](#), [366](#)).

Les acides organiques font partie des différents additifs alimentaires pouvant être ajoutés soit à l'alimentation des animaux, soit à leur eau de boisson. Une grande variété d'acides aux propriétés physiques et chimiques différentes existe (367). Ils peuvent être utilisés individuellement, mais ce sont plus souvent les mélanges d'acides qui sont privilégiés afin d'assurer un plus large spectre d'activité (367, 368).

Les acides organiques ont une activité antimicrobienne sélective, par exemple contre *E. coli* mais pas contre les lactobacilles. On connaît plusieurs facteurs pouvant influencer l'activité antibactérienne d'un acide organique : sa formule chimique, la valeur de son pKa, sa forme chimique, son poids moléculaire, la susceptibilité du micro-organisme ciblé, ainsi que l'espèce animale en cause.

▪ **Mécanisme d'action**

Le mécanisme d'action des acides organiques reflète probablement leur nature antibactérienne, telle la diminution du pH à l'intérieur des intestins, action comme agents conservateurs de l'eau de boisson et des aliments, inhibition de la contamination microbienne, avec des effets ultérieurs sur la physiologie de la culture (369). Selon le rapport de la chambre d'agriculture Bretagne, les acides organiques possèdent différents mécanismes d'action (346).

- **Acidification du contenu stomacal** : un pH de 2-4 optimise l'activité des protéases (pepsine). Le pouvoir tampon de l'aliment s'oppose à la variation d'acidité du tube digestif et remonte le pH d'où la nécessité d'acidifier l'aliment afin de diminuer le pH stomacal.
- **Action antifongique** : l'apport de certains acides organiques permet de décontaminer l'aliment ou l'eau de boisson. L'acide organique peut inhiber la croissance des moisissures et prévenir la formation de mycotoxines. Ils n'ont cependant aucun effet direct sur les mycotoxines déjà présentes dans les céréales au champ.
- **Action antibactérienne** : spécifique de l'acide organique considéré notamment grâce à l'efficacité de leur anion présent. L'acide organique dans l'intestin évite la colonisation des parois intestinales par les bactéries pathogènes à Gram négatif (*E. coli*, salmonelles...) provoquant des inflammations et nuisant à l'assimilation des nutriments et des minéraux. Les acides organiques non-dissociés pénètrent dans la cellule, cette pénétration provoque la libération des ions H⁺ qui acidifient le contenu cellulaire et poussent la bactérie à utiliser de l'énergie afin de remonter le pH

intracellulaire, entraînant alors la mort de la cellule bactérienne par épuisement des réserves d'énergie servant à maintenir l'homéostasie interne (**Figure 32**) ([370](#), [371](#)).

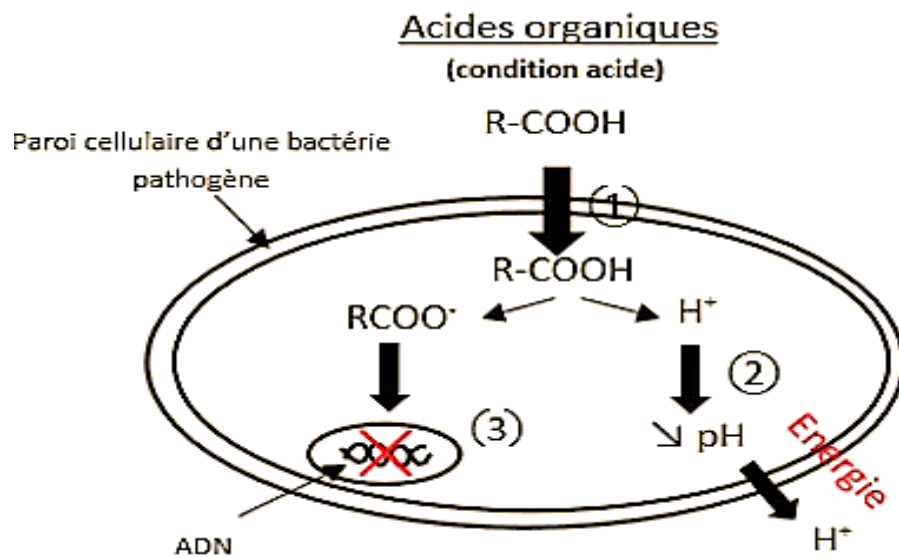


Figure 32 : Mode d'action des acides organiques sur une cellule bactérienne ([346](#)).

- **Développement de la flore intestinale** : Les acides organiques favorisent le développement des bactéries type *Lactobacillus* (l'acide lactique favorise la flore acidophile) qui sont bénéfiques pour la flore intestinale.
- **Activation des enzymes de dégradation des protéines**. Les acides organiques favorisent la dégradation des matières azotées

- **Spectre d'activité des acides organiques**

Chaque acide posséderait ainsi son spectre d'activité et pourrait influencer différemment le microbiote intestinal, par exemple :

- L'acide butyrique stimulerait la prolifération épithéliale intestinale, posséderait une action anti-inflammatoire et renforcerait la barrière muqueuse intestinale en augmentant la production de peptides antimicrobiens dans le mucus intestinal et en stimulant l'expression de protéines associées aux jonctions serrées ([367](#)).
- L'acide propionique représente un substrat majeur pour la néoglucogenèse pour les cellules, il pourrait inhiber la virulence d'entérobactéries pathogènes ([372](#)).
- L'acide lactique favorise le développement des lactobacilles (qui vont elles-mêmes produire de l'acide lactique) qui vont assurer un rôle de compétition vis-à-vis des

colibacilles et des salmonelles. Il a également un effet bactéricide important. Le **tableau 5** présente les actions différenciées des certaines acides organiques.

Tableau 5: Actions différenciées des acides organiques (346).

Acides	Levures	Champignons	Bactéries-Gram+	Bactéries-Gram-
Formique	++	++	+	+++
Acétique	+++	+	++	-
Propionique	++	+++	++	+/-
Lactique	-	-	---	+++
Sorbique	+++	+++	+++	++

V-1-7) Les polyamines

▪ Généralités

Les polyamines sont des molécules polycationiques à pH physiologique possédant un squelette hydrocarboné et de multiples groupes amine (373). En 1678, Leeuwenhoek découvrit la première substance polyamine dans le sperme humain appelée spermine (374, 375). Ainsi, la spermine est une polyamine impliquée dans le métabolisme cellulaire présent dans toutes les cellules eucaryotes. On le trouve également dans une grande variété d'organismes et de tissus et constitue un facteur de croissance essentiel pour certaines bactéries. De plus, la spermine est associée aux acides nucléiques et on pense qu'elle stabilise la structure hélicoïdale, en particulier dans les virus. Depuis la découverte de la spermine, quatre polyamines aliphatiques ont été découvertes biologiquement, à savoir la putrescine, la spermidine, la spermine et l'agmatine (376). Ces polyamines ont été isolées indifféremment de bactéries issues à la fois de la flore microbienne du tractus gastro-intestinal et de cellules eucaryotes d'animaux ou d'êtres humains.

Ainsi, la cadavérine et la putrescine sont toutes les deux produites par la dégradation des acides aminés tels que la lysine. Cependant, ces diamines ne sont pas purement associées à la putréfaction, elles sont également produites dans des petites quantités par les êtres vivants et sont partiellement responsables des odeurs distinctives d'urine et de sperme (374). La spermidine est une polyamine impliquée dans le métabolisme cellulaire. Ses actions connues incluent : l'inhibition de l'oxyde nitrique synthase neuronal, nNOS (377, 378), l'assistance au processus de transcription *in vitro* de l'ARN *via* la stimulation de l'activité de la

polynucléotide kinase T4 et de l'ARN polymérase de T7 (379). On a également découvert que la spermidine réduit le vieillissement chez les levures, les mouches, les vers et les cellules immunitaires humaines en induisant l'autophagie (380).

Les polyamines sont essentielles à la croissance cellulaire et la synthèse des protéines (381) et leur contenu est régulé par la biosynthèse, la dégradation et le transport cellulaire (382). L'émergence d'agents pathogènes multirésistants est responsable de nombreuses infections microbiennes et l'inefficacité de nombreux traitements antimicrobiens ont nécessité la recherche de nouvelles classes de polyamino-antibiotiques (383).

▪ **Synthèse de polyamines**

La biosynthèse des polyamines est réalisée par trois enzymes, à savoir l'ornithine décarboxylase, la putrescine amino-propyltransférase et la spermidine amino-propyltransférase (Figure 33). Ainsi, la putrescine est synthétisée par la décarboxylation de l'ornithine, tandis que les autres polyamines sont produites à partir de la putrescine par fixation du groupe de la propylamine sous l'action de la spermine et de la spermidine synthase. Enfin, les polyamines peuvent être métabolisées par de nombreuses enzymes oxydase et acétyl-transférase, permettant ainsi leur interconversion ou leur élimination (381).

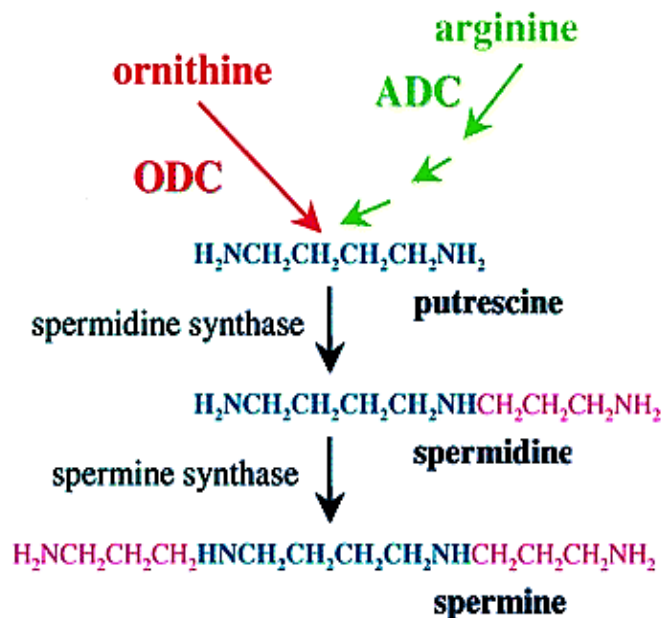


Figure 33 : Synthèse de polyamines (384).

▪ **Rôles et propriétés des polyamines**

Les polyamines sont des composés omniprésents dotés de propriétés différentes (**Figure 34**), telles que la croissance cellulaire, la réparation cellulaire, la transcription génique, la synthèse de protéines et d'acides nucléiques ([381](#)).

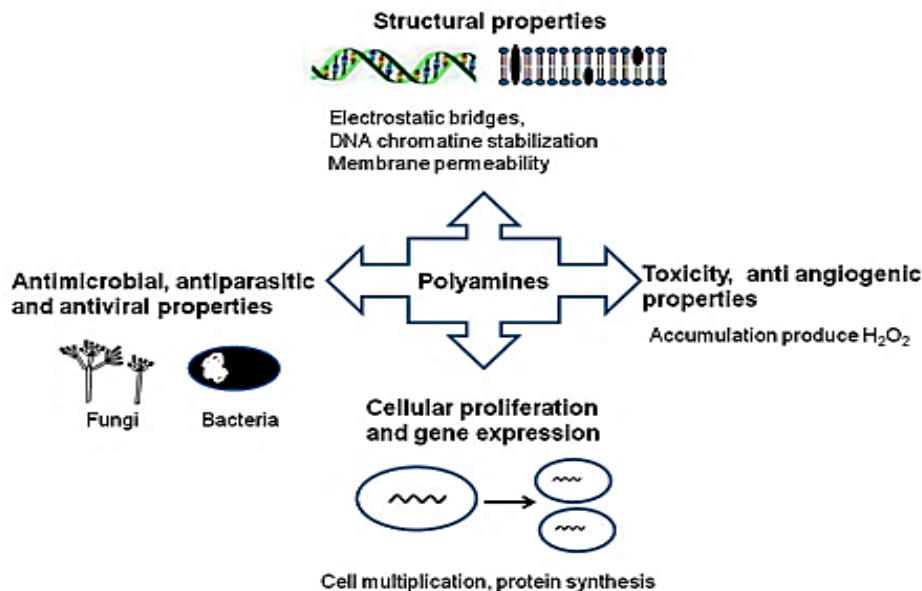


Figure 34 : Rôles et propriétés des polyamines ([385](#)).

Les polyamines possèdent des charges positives et peuvent servir de ponts électrostatiques entre les charges de phosphates négatives et d'autres polyanions tels que l'ADN et l'ARN ([373](#), [381](#)). Les polyamines jouent un rôle crucial dans la croissance et la multiplication des cellules procaryotes ([332](#)). Ils favorisent par exemple la croissance de nombreuses bactéries telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria perflava* alors qu'ils conduisent à une inhibition de la croissance bactérienne à Gram positif à haute concentration. Les polyamines jouent également un rôle important dans les membranes externes, en particulier dans les porines, comme dans *E. coli*, où la putrescine et la spermidine se lient à l'acide aspartique des porines OmpC et OmpF produisant une modification de la charge du pore en diminuant la perméabilité de la membrane externe ([373](#)). De plus, les polyamines peuvent interagir avec les phospholipides dans la membrane. Dans ce contexte, la spermine et la spermidine sont capables de réguler l'activité membranaire du canal ionique en bloquant en particulier les canaux potassiques ou les récepteurs du glutamate. Ainsi, les polyamines sont également connues pour stabiliser les cellules membranaires en modulant le facteur de croissance épidermique EGF ([381](#)).

▪ **Activités biologiques**

Les polyamines ont été largement étudiées comme agents anti-infectieux. Des activités antivirales et antiparasitaires ont été rencontrées même si les activités antimicrobiennes restent la principale voie étudiée.

PARTIE II : Objectifs de la thèse

L'antibiorésistance est un problème de santé publique qui compromet le traitement efficace d'un nombre croissant d'infections impliquant des bactéries. Comme nous venons de le voir, la résistance bactérienne est un mécanisme naturel et inéluctable, néanmoins l'usage abusif et excessif des antibiotiques (ATBs) en médecine humaine et vétérinaire accélère et accentue fortement le processus d'antibiorésistance.

En effet, nous devons faire face aujourd'hui au revers de la médaille que fut l'une des plus grandes avancées de la médecine moderne, la découverte des ATBs. Si nous n'agissons pas aujourd'hui, nous prenons le risque de faire un voyage dans le temps qui nous ramènerait directement dans l'ère pré-ATBs où nous pourrions de nouveau craindre la moindre infection. Afin d'éviter ce scénario catastrophe, de nombreux pays ont mis en place des plans nationaux afin de sauvegarder l'efficacité des ATBs en encourageant la recherche, à la fois de nouveaux antimicrobiens mais également le développement de thérapies alternatives susceptibles de lutter contre ce fléau.

C'est dans le contexte d'une pénurie de nouvelles molécules antibiotiques et l'apparition croissante de bactéries multirésistantes, et dans l'optique de la recherche de nouvelles molécules antibactériennes que se situe ce travail de thèse.

Cette thèse en microbiologie et en nanochimie, est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire régional de recherche en agroalimentaire et biotechnologies : Institut Charles Viollette, et l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) et a été effectuée dans le cadre d'un projet ANR (SINCOLISTIN).

Ce projet vise à développer de nouveaux concepts rationnels et modernes permettant une meilleure gestion des antibiotiques.

Ainsi le principal objectif est de réduire significativement la quantité de colistine utilisée dans les élevages de porcs. Pour cela nous avons développé une approche de thérapie combinatoire basée sur l'association de cet antibiotique avec des bactériocines, par la conception de nouvelles formulations, ou en l'immobilisant sur des nanoparticules (50-100nm) et/ou microsphères (5-20nm). Les antimicrobiens ainsi fixés sur les nanoparticules devront être libérés directement dans le système d'infection, et devront résister à l'environnement défavorable du système gastro-intestinal ciblé.

Ce travail est articulé autour de trois axes. La première consiste en l'élaboration de nanoparticules à l'échelle nanométrique, et la compréhension de plusieurs paramètres physico-chimiques liés au procédé de fabrication et de caractérisation. Le second axe consiste en la combinaison de l'antibiotique (colistine) et/ou les bactériocines avec des nanoparticules, en mélange avec des petites molécules (polyamines, huiles essentielles, acides organiques, bactériocines) et la compréhension de plusieurs paramètres physico-chimiques.

Le troisième et dernier axe repose sur l'évaluation des propriétés biologiques des combinaisons réalisées.

Le présent manuscrit est divisé en cinq parties :

La première partie (**partie I**) est une synthèse bibliographique, ou l'état de l'art, concernant la problématique traitée ainsi que des stratégies et des molécules envisagées. Elle présente notamment les notions : d'antibiotiques, d'antibiorésistance et ses mécanismes, les infections à *E. coli*, la colistine et ses usages à la fois en médecine humaine et vétérinaire, les peptides antimicrobiens : leurs modes d'action et leurs activités contre des BGN, les huiles essentielles et leurs activités antimicrobiennes, les acides organiques, les plantes médicinales et leurs extraits, les polyamines et les nouveaux peptides extraits de la peau des grenouilles ayant une activité anticancéreuse et antibactérienne, suivies d'une présentation sur la nanotechnologie des nanoparticules.

La partie II est une présentation de sujet de thèse.

La partie III regroupe les matériels et méthodes utilisés durant ce projet de thèse.

La partie IV présente les principaux résultats obtenus et leurs discussions. Nous y traitons plus en détails les résultats obtenus et de leur importance scientifique au vu des différentes données de la littérature.

La partie V est une discussion générale des résultats obtenus et une conclusion générale de la thèse.

PARTIE III : Matériels et Méthodes

I) Préparation du matériel biologique

I-1) Acide alginique (dit « alginate »)

L'alginate (ALG) est un polysaccharide linéaire, anionique, constitué des sels des deux acides uronique dérivant du mannose : l'acide -D-mannuronique (chaîne M) et son epimère l'acide-L-guluronique (chaîne G) (**Figure 35**) Il est découvert par Stanford en 1881 dans l'algue *Laminaria digitata*, sous la forme d'acide alginique. L'alginate est produit presque uniquement par les algues brunes et constitue une part importante de la structure membranaire de leurs cellules.

Plusieurs critères du choix de l'alginate. Il est préférable de travailler avec un alginate dont la teneur en unités G reste autour de 0,5 pour plusieurs raisons :

- Les chaînes M assurent la flexibilité et les chaînes G assurent la rigidité (et donc augmente la fragilité), il est nécessaire de travailler avec un matériau plus souple même s'il est au final moins résistant ([386](#)).

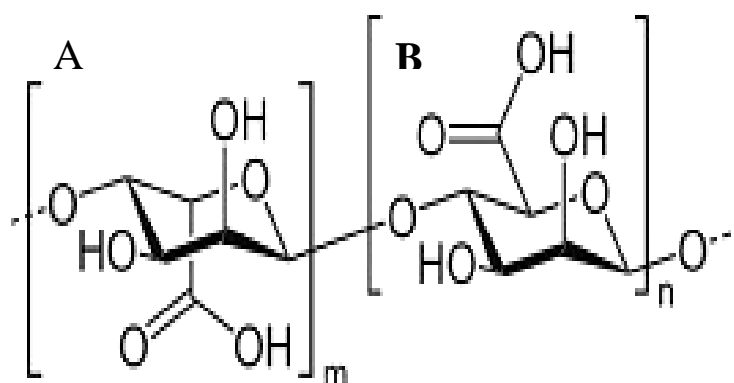


Figure 35: Structure de l'acide alginic, A: acide-L-guluronique ; B : acide-D-mannuronique([387](#))

- Ce type d'alginate est couramment utilisé dans l'industrie alimentaire et est donc facilement accessible. Les volumes produits ainsi que la disponibilité sont donc importants. C'est aussi très intéressant d'un point de vue économique.

L'Alginate utilisé ici est un sel de sodium d'acide alginique fourni par Sigma-Aldrich, France (réf. 180947-250G), de très faible viscosité et d'environ 20 000 g.mol⁻¹.

I-2) Antibiotiques

L'antibiotique utilisé est la colistine qui agit sur les BGN, notamment *E. coli*.

- **La colistine**

La colistine est un antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines, du groupe des polymyxines E. Elle est produite par certaines souches de *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. La colistine est un antibiotique ancien découvert en 1950 par des chercheurs japonais. La colistine utilisée ici est le sulfate colistine fourni par Sigma-Aldrich, France (réf-C4461-100MG), de solubilité 50 mg/mL d'eau, et de 15000 U/mg.

I-3) Les cellules eucaryotes

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour les tests de la cytotoxicité :

- **IPEC-1**

La lignée cellulaire IPEC-1 est une lignée de cellules épithéliales intestinales dérivées du petit intestin d'un Mini-Porc New Hampshire nouveau-né.

- **HT-29**

C'est une lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain de morphologie épithéliale. Ces cellules sont sensibles aux médicaments chimiothérapeutiques 5-fluorouracile et oxaliplatine, options de traitement standard du cancer colorectal.

I-4) Souches bactériennes

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, dix souches bactériennes ont été utilisées à savoir : Six souches d'*E. coli* sensibles et quatre souches d'*E. coli* résistantes. Le **tableau 6** indique les différentes souches et leurs caractéristiques.

Tableau 6 : Souches bactériennes utilisées au cours de ce travail.

Souches		Caractéristiques	Références
<i>E. coli</i> 184	(Résistante)	<i>mcr</i> 1+	ANSES
<i>E. coli</i> ER289	(Résistante)	<i>mcr</i> 1-	ANSES
<i>E. coli</i> ATCC8739	(Sensible)	Souche de référence	Institut Pasteur
<i>E. coli</i> CIP7628	(Sensible)	Souche de référence	Institut Pasteur
<i>E. coli</i> SBS36	(Sensible)	LPS tronqué	Boquet CEA Saclay(France)
<i>E. coli</i> TOP10	(Sensible)	LPS-	Thermofisher Scientific (USA)
<i>E. coli</i> E4A4 WT	(Sensible)	Souche de terrain	ANSES
<i>E. coli</i> E4A4 variant	(Résistante)	Variant insensibilisé	Institut Charles violette
<i>E. coli</i> E5A16 WT	(Sensible)	Souche de terrain	ANSES
<i>E. coli</i> E5A16 variant	(Résistante)	Variant insensibilisé	Institut Charles Violette

I-5) Les huiles essentielles (HE)

Six HE ont été investiguées : Menthol, Thymol, α -pinène, carvacrol, géraniol et farnésol

- **Thymol**

Le thymol est une substance naturelle ; c'est un phénol contenu dans l'huile de thym et dans les huiles essentielles (volatiles) de plusieurs autres plantes. Il se présente sous forme de cristaux incolores avec une odeur aromatique caractéristique, considérée comme agréable. Il est soluble dans les alcools, le gras et l'huile et peu soluble dans l'eau. Le thymol utilisé ici fourni par Sigma-Aldrich (réf- T0501-100G), de formule 2-isopropyl-5-méthylphénol, 5-méthyl-2-(1-méthyléthyl) phénol, 5-méthyl-2isopropylphénol, de solubilité 50 mg/mL dans l'éthanol, et de poids moléculaire 150.22 g/mol.

- **Menthol**

Le menthol est un terpénoïde, présent dans les huiles essentielles de la famille des menthes (*Mentha* spp), comme la menthe poivrée, la menthe verte etc. Le menthol (C₁₀H₂₀O) est solide à température ambiante, formant un long cristal possédant une partie lipophile. Il n'est pas ou peu soluble dans l'eau, mais très soluble dans l'alcool et l'huile. Le menthol utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf- M2780-25G-A) est (1R, 2S, 5R)-(-)-Menthol de

formule (1R, 2S, 5R)-2-isopropyl-5-méthylcyclohexanol, 5-méthyl-2-(1-méthyléthyl)cyclohexanol, de poids moléculaire 156.27 g/mol et de pureté 99%.

- **α -Pinène**

L'alpha-pinène est un monoterpène tricyclique. Il est présent dans de nombreuses plantes, comme le pin, la menthe, la lavande, la sauge et le gingembre. On le trouve aussi dans l'essence de térébenthine. L'alpha-pinène (C₁₀H₁₆) liquide utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf- 268070-5G) est (+)- α -Pinène de formule (1R, 5R)-2-Pinene, (1R, 5R)-2, 6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-ene, de poids moléculaire 136.23 g/mol et de pureté 99%.

- **Carvacrol**

Le carvacrol est un phénol qui est un dérivé monoterpénique naturel du cymène. Un inhibiteur de la croissance bactérienne, il est utilisé comme additif alimentaire. Il joue le rôle de composant huileux volatil, d'agent aromatisant, d'agent antimicrobien, et de produit agrochimique. Il fait partie des phénols, d'un monoterpénoïde p-menthane et d'un agent antifongique botanique. Il provient d'un hydrure de p-cymène. Le carvacrol (C₁₀H₁₄O) liquide utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf-282197-10G) est carvacrol de formule 5-Isopropyl-2-methylphenol, de poids moléculaire 150.22 g/mol et de pureté 98%.

- **Géraniol**

Le géraniol a été utilisé dans l'évaluation sur le terrain de composés volatils induits par les herbivores synthétiques comme attractifs pour les insectes utiles. Il a été utilisé pour évaluer le pouvoir suppresseur de tumeur des isoprénoïdes *in vitro* et *in vivo*. Le géraniol (C₁₀H₁₈O) liquide utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf-163333-100G) est de formule trans - 3,7- diméthyl- 2,6- octadien-1-ol, de poids moléculaire 154.25 g/mol et de 98% de pureté.

- **Farnésol**

Le farnésol est un alcool sesquiterpène acyclique au parfum délicat. Liquide incolore, il est insoluble dans l'eau mais oléosoluble. Il peut être d'origine naturelle (isolat d'huile essentielle) ou synthétique. Le farnésol est utilisé dans la fabrication de produits biologiques pour le traitement de l'environnement. C'est un pesticide naturel contre les acariens et certainement un précurseur de l'hormone juvénile de plusieurs insectes, ce qui en fait un

ingrédient utilisé comme inhibiteur de croissance des larves de puces par exemple. Le farnésol ($C_{15}H_{26}O$) liquide utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf-F203-25G) est de formule 3,7,11-Triméthyl-2,6,10-dodécatrien-1-ol, de poids moléculaire 22.37 g/mol et de 95% de pureté.

I-6) Les acides organiques

Cinq acides organiques ont été utilisés : Acide lactique, acide citrique, acide propionique, acide formique et acide sorbique.

- **Acide lactique**

L'acide lactique ($C_3H_6O_3$), liquide fourni par Sigma-Aldrich (réf- 252476-100G) est de formule $CH_3CH(OH)CO_2H$, de poids moléculaire 90.08 g/mol, et de concentration $\geq 85\%$ dans l'eau.

- **Acide citrique**

L'acide citrique ($C_6H_8O_7$) est extrait de fruits comme le citron ou les groseilles. Biodégradable et non toxique, il se caractérise par ses effets : antioxydant, neutralisant, conservateur, acidifiant. L'acide citrique utilisé ici est le sel trisodique de l'acide citrique ($C_6H_5O_7Na_3$) fourni par Sigma-Aldrich (réf- C3674-100G), de poids moléculaire 258.07 g/mol.

- **Acide propionique**

L'acide propionique ($C_3H_6O_2$) est un acide carboxylique naturel qui, à l'état pur, se présente sous forme d'un liquide corrosif incolore à l'odeur désagréable. Il est miscible dans l'eau. L'acide propionique (PA), également appelé acide propanoïque, est un acide gras à chaîne courte principalement utilisé comme conservateur alimentaire. Le PA liquide utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf- 402907-100ML), de poids moléculaire 74.08 g/mol.

- **Acide formique**

L'acide formique est retrouvé dans le dard et les piqûres de plusieurs insectes comme les abeilles et les fourmis, mais aussi sur les poils qui composent les feuilles de certaines plantes

telles que les orties. Son nom vient du mot latin formica qui signifie fourmis, car sa première isolation a été réalisée par distillation de corps de fourmis. C'est un composant naturel du miel. Cependant, son efficacité est variable selon les régions et surtout la température. L'acide formique (CH_2O_2) utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf- W248703-1KG-K), de poids moléculaire 46,03 g/mol.

- **Acide sorbique**

L'acide sorbique a été isolé à partir des baies immatures du sorbier, *Sorbus aucuparia*, un petit arbre des régions tempérées. Il est comme un conservateur alimentaire. L'acide sorbique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$) solide utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf- S1626-100G) est de formule α -*trans*- γ -*trans*-Sorbic acid, (*E, E*)-1,3-Pentadiene-1-carboxylic acid, 2,4-Hexadienoic acid, 2*E*, 4*E*-Hexadienoic acid, *trans, trans*-2,4-Hexadienoic acid, de poids moléculaire 112,13 g/mol.

- **Acide malique**

L'acide malique est un acide alpha-hydroxylé très courant dans la nature. On le trouve dans de nombreux aliments comme la pomme verte, les poires, le jus de raisin. L'acide malique entre dans la composition de nombreux compléments alimentaires. L'acide malique est connu pour diminuer les risques de calculs rénaux. L'acide malique ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$) solide utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf- 240176-50G) est (\pm)-2-Acide hydroxysuccinique, DL-Acide hydroxybutanedioïque, de poids moléculaire 134,09 g/mol et de pureté $\geq 99\%$.

- **Acide acétique**

L'acide acétique est un liquide incolore de la famille des carboxyliques. C'est l'un des plus vieux conservateurs alimentaires. On en retrouve des traces chez l'homme, dans la sueur et le sang, ou chez les végétaux, dans la sève et le bois. Les laboratoires pharmaceutiques utilisent l'acide acétique pour son grand pouvoir contre les bactéries. Selon l'organisation mondiale de la santé, l'acide acétique est inscrit sur sa liste des médicaments essentiels. L'acide acétique ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) liquide utilisé ici est fourni par Fisher Scientific France (MDL-36152) est « Acetic Acid Glacial », A/0400/PB15, de poids moléculaire 60,052 g/mol.

I-7) Les acides inorganiques

- **Acide chlorhydrique**

L'acide chlorhydrique (HCl) liquide utilisé ici est fourni par Fisher Scientific France (MDL- 11324) est Hydrochloric Acid, 37%, d=1,18, A/0400/PB15, de poids moléculaire 36,46 g/mol.

I-8) Les polyamines

- **La spermine**

C'est un composé organique présent dans les tissus et qui joue le rôle d'hormone de croissance. Elle stabilise l'ADN, en particulier chez les virus. Il s'agit d'une polyamine présente dans le sperme et dans plusieurs autres fluides corporels. Elle est utilisée en pharmacologie pour synthétiser certains médicaments. La spermine (C₁₀H₂₆N₄) cristalline utilisée ici est fournie par Sigma-Aldrich (réf- 85590-5G) est N, N'-Bis (3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane, de poids moléculaire 202,34 g/mol.

- **La spermidine**

La spermidine est une polyamine formée à partir de la putrescine. On la trouve dans presque dans tous les tissus en association avec des acides nucléiques. La spermidine (C₇H₁₉N₃) utilisée ici est fournie par Fisher Scientific France- ACROS Organics (MDL-MFCD00008229) est N'-(3-aminopropyl) butane-1,4-diamine de poids moléculaire 125,45 g/mol.

I-9) Composés organiques

- **La pipérazine**

La pipérazine est un composé organique constitué d'un cycle saturé à six atomes contenant deux atomes d'azote en positions opposées. Elle est soluble dans l'eau, c'est un anthelminthique agissant par blocage neuromusculaire qui est actif sur les oxyures (*Enterobius vermicularis*) et les ascaris (*Ascaris lumbricoides*). La pipérazine(C₄H₁₀N₂) liquide utilisée est fournie par Sigma-Aldrich (réf-P45907-5G) est de formule 1, 4-Diazacyclohexane, Diethylenediamine, de poids moléculaire 86.14 g/mol, soluble dans l'eau.

I-10) Peptides antimicrobiens

- **E20 (Extrait à 20% d'acétonitrile)**

C'est un extrait peptidique actif produit par *Lactobacillus paracasei* ICVB411. Le surnageant brut de *Lb. paracasei* ICVB411 est fractionné puis filtré sur une cartouche C18 en phase inversée. Deux concentrations de solvant (à 10 et à 20% acétonitrile) sont utilisées pour éliminer une partie des contaminants présents et récupérer la fraction active E20.

- **Dermaseptine B2 (DRS-B2)**

La dermaseptine B2 (DRS-B2) est le membre le plus étudié de la famille DRS. Ce polypeptide cationique amphipathique (+3) long de 33 acides aminés a une masse moléculaire de 3180 Da avec un tryptophane (Trp) en position 3 et six lysines (Lys) irrégulièrement espacés le long de la séquence. Le DRS-B2 a une activité antibactérienne membranaire élevée sur un large spectre de BGP et à BGN, de levures, de protozoaires et de champignons filamenteux, et est considéré comme le peptide le plus actif de sa famille au spectre actif le plus large, avec une CMI en micromolaire (388). DRS-B2 est capable d'inhiber la prolifération de nombreuses lignées de cellules tumorales humaines *in vitro*. De plus, la croissance des cellules d'adénocarcinomes de prostate humaine PC3 greffées chez des souris athymiques est fortement inhibée par la DRS-B2 lorsque les animaux sont traités en peritumoral avec ce peptide (389).

- **Hormone-Dermaseptine B2 (HB2)**

C'est un polypeptide cationique amphipathique de 43 acides aminés, et une masse moléculaire de 4416 Da avec un tryptophane (Trp) en position 3 et une tyrosine (tyr) en position 6. L'hormone H est de 10 acides aminés à la position 6, remplacent la L-Lysine par D-lysine.

I-11) Enzymes

- **α -chymotrypsine de pancréas bovin degré I**

Il est fourni par PancReac AppliChem (réf- A4531), sous forme de poudre lyophilisée sans sel, d'origine du pancréas bovin. Son activité est 1500 unités/mg.

- **Trypsine de pancréas bovin**

Elle est fournie par PancReac AppliChem (réf- A3964) sous forme de poudre lyophilisée sans sel, d'origine de pancréas de bœuf. Son activité est de 2500 unités/mg et de poids moléculaire de 23.8 KDa.

- **Pepsine de muqueuse gastrique de porc**

C'est une peptidase courante pour digestion des protéines et est couramment utilisée dans la préparation de fragments Fab à partir d'anticorps. La pepsine, issue de la muqueuse gastrique de porc, a été utilisée pour hydrolyser des échantillons cervicaux secs chez la souris et pour hydrolyser des liaisons peptidiques et non des liaisons amides ou esters. La pepsine, fournie par Sigma-Aldrich (Réf- P6887-250MG), est la pepsine d'estomac de porc, sous forme poudre lyophilisée, de poids moléculaire 35 KDa et de solubilité dans l'eau de 10 mg/mL.

- **Albumine de sérum bovin**

L'albumine de sérum bovin est une protéine modèle pour diverses études et est composée de 583 acides aminés. Il s'agit d'une protéine soluble dans l'eau, d'un poids moléculaire de 66,4 kDa. Elle est fournie par Sigma-Aldrich (Réf- A9647-10G), sous forme de poudre lyophilisée.

I-12) Les colorants

- **CCK8 (Kit de comptage cellulaire-8)**

Le CCK-8 (WST-8) est le colorant le plus sensible pour déterminer le nombre de cellules viables au cours de la prolifération cellulaire et les tests de cytotoxicité. Le CCK8 utilisé ici est fourni par Sigma-Aldrich (réf- 96992-100TESTS-F), il est stable à 4 °C.

- **Rhodamine B (RhB)**

La rhodamine B est un composé organique colorant, détectable par des instruments appelés fluoromètres. Elle est utilisée en microbiologie comme colorant fluorescent, pour déterminer les directions d'écoulement et de transport. La rhodamine B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$), Sigma-Aldrich (réf-R6626-25G), est la tétraéthylrhodamine de poids moléculaire 479.01 g/mol.

- **QuantiPro Buffer QA (M3810)**

Le réactif QA est présenté dans une bouteille en plastique carrée contenant 250 mL d'une solution composée de carbonate de sodium, de tartate de sodium et de bicarbonate de sodium dans NaOH 0,2 M, pH 11,25.

- **QuantiPro BCA QB (M3685)**

Le réactif QB est présenté dans une bouteille en plastique carrée contenant 250 mL d'une solution d'acide bicinchoninique à 4% (p / v), pH 8,5.

- **Sulfate de cuivre (II) QC, solution de pentahydrate à 4% (C2284)**

Le réactif QC est fourni dans une bouteille en plastique contenant 12 mL d'une solution à 4% (p / v) de sulfate de cuivre (II) pentahydrate.

I-13) Les fixateurs

- **Formol**

Le Formol est un composé organique de la famille des aldéhydes de formule CH_2O . Ce composé organique porte différents noms : le méthanal, formaldéhyde ou aldéhyde formique. Il est facilement soluble dans l'eau et il est utilisé comme fixateur de certains échantillons biologiques. Le formol, Sigma-Aldrich (réf- F8775-25ML), est Formalin de poids moléculaire 30.03 g/mol.

- **Glutaraldéhyde**

Le glutaraldéhyde est un liquide huileux incolore, d'odeur caractéristique, soluble dans l'eau et l'éthanol. Le glutaraldéhyde est utilisé comme agent désinfectant ou agent de réticulation de protéines, et comme fixateur de matériel biologique. Le glutaraldéhyde ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$), Sigma-Aldrich (Réf- 340855-25ML), est la solution de dialdéhyde glutarique, pentane-1,5-dial, de poids moléculaire 100.12 g/mol et de densité 1,106 g / mL à 25 °C.

I-14) Milieux de culture

Les milieux BHI (Brain Heart Infusion) et la GO (gélose nutritive) (Annexe 1) ont été utilisés pour la croissance des souches bactériennes cibles. Ces milieux sont riches en éléments nutritifs et permettent une croissance rapide des bactéries.

Pour le test de la cytotoxicité sur des lignées cellulaires, le milieu DMEM complet (Annexe 1) a été utilisé. C'est un milieu de culture cellulaire nécessaire au maintien et à la prolifération des cellules.

II) Appareils

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation de plusieurs appareils (Annexe 2).

- Broyeur à billes RETSCH (PM 100 S10)
- Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Royaume-Uni)
- Nanodrop de type THERMO SCIENTIFIC NANODROP ONE C.
- Microbalance de type Mettler-Toledo TM XPr6U
- Vortex zx3 vitesse variable velp.
- Bain à ultrasons BRANSON 2800.
- pH-mètre: Mettler Toledo Seven Easy S20 pH Meter.
- Spectrophotomètre Biotek ELx808
- Microscope électronique ULTRA 55 (Zeiss, München, Allemagne)
- Microscope confocal (droit)-NIKON-A1-R
- Microscopie à fluorescence (inversé)-LEICA-AF6000-X
- Microscope électronique en transmission JEOL JEM-2100FX
- Analyse thermique NETZSCH TG 209F3
- Spectrophotomètre UV-visible Perkin-Elmer Lambda 950
- Spectrométrie de masse MALDI-TOF Bruker Autoflex Speed t (Bruker Daltonics, Wissembourg)
- Compteur de colonie (Colony counter 50971, BIOBLOCK SCIENTIFIC)
- Spectrophotomètre SAFAS Xenius XML
- Microscope optique
- Spectrophotomètre UV- mini 1240
- Centrifugeuse 5804 Eppendorf
- ThermoScientific FTIR (Nicolet 8700)
- Incubateur Multitron Cell INFORS-HT
- Incubateur à CO₂ HERAcell 150i

III) Techniques de préparation

III-1) Préparation du tampon phosphate (PBS)

Le tampon phosphate salin (PBS) a été préparé en utilisant de l'eau ultra pure avec 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ et 0,24 g KH₂PO₄ pour un litre de solution. Le pH est ajusté ensuite à 7. Le tampon PBS est additionné de 0,02% (p/v) en azide de sodium pour éviter tout développement bactérien puis filtré (filtre Millipore de 0,45 µm de porosité) et conservé à 7°C.

III-2) Préparation du tampon acétate (pH 5)

Le tampon acétate a été préparé en mélangeant 14.8 mL d'une solution d'acide acétique (0.2 M) avec 35.2 mL d'une solution d'acétate de sodium 0.2 M dilués à 100 mL d'eau stérile.

III-3) Préparation d'une solution d'acide lactique

Une solution d'acide lactique (84 µg.mL⁻¹) de pH 5 a été préparée par dilution de 20 µL d'acide lactique (85%) dans 230 mL d'eau ultra pure.

III-4) Préparation d'une solution d'acide citrique

Une solution d'acide citrique (8.32 mg.mL⁻¹) a été préparée par ajout de 4.17 g pour 500 mL d'eau ultra pure. Le pH est ajusté ensuite à 5 par ajout de quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium (6 M).

III-5) Préparation des NPs alginate

L'élaboration des nanoparticules d'alginate a été effectuée par un procédé top-down avec l'appareil BALL MILL RETSCH (PM100S10). 2 grammes de poudre d'alginate de sodium sont placés dans un pot de broyage de 1.050 kg, pendant 10 heures à 440 rpm (pause chaque 5 minutes avec une rotation inverse chaque 10 minutes), en contact avec des billes d'oxyde de zirconium de 112 grammes (**Figure 36**). La même opération est répétée plusieurs fois pour la préparation d'un stock pour les tests in-vivo.

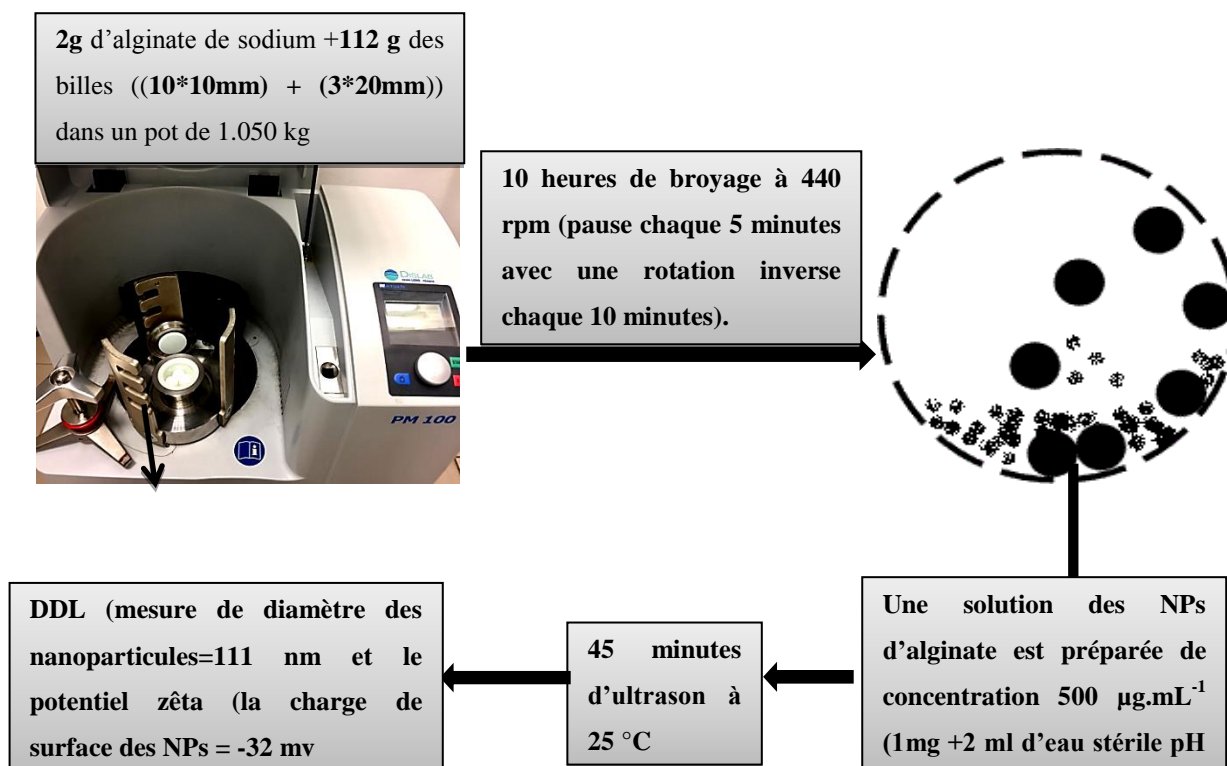


Figure 36: Chaîne de préparation des NPs alginate.

III-6) Préparation des NPs alginate fluorescentes

La préparation de nanoparticules d'alginate-rhodamine B se fait par ajout de 1% de la rhodamine B avant 20 minutes de la fin du dernier cycle de broyage (après 9 heures 40 minutes de broyage). Deux solutions ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de nanoparticules alginate-rhodamine B ont été préparées et mises aux ultrasons pendant 60 minutes à 25°C . Une solution a été dialysée pendant 24 heures pour la mesure en spectroscopie UV-visible à 630 nm et l'imagerie confocale et l'autre solution pour la mesure en DLS.

- **Dialyse**

Une solution (0.5 mg.mL^{-1}) de nanoparticules alginate –rhodamine B a été dialysée pendant 24 heures sur une membrane semi-perméable de 14 KDa. Enfin de dialyse, la solution à l'intérieur du sac de dialyse a été récupérée pour la mesure en spectroscopie UV-visible à 630 nm, et analyses en DDL et fluorescence.

III-7) Préparation des solutions pour l'analyse en HPLC.

Une série de solutions a été préparée par dilution dans de l'eau et homogénéisée par sonication pendant 45 min à 25°C . Ces différentes solutions ont permis de générer les courbes

étalons pour la quantification de la colistine, de DRS-B2 et HB2 adsorbées sur les nanoparticules d'alginate par la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La mesure en HPLC a été effectuée pour des solutions avec et sans nanoparticules d'alginate.

Une série de solutions de colistine de différentes concentrations ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $175 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $225 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a été préparée par dilution dans de l'eau distillée et homogénéisée par sonication pendant 45 min à 25°C .

Une série de solutions de DRS-B2 de différentes concentrations ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $3.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $11 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $27 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $42 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $46 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $57 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $129 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $157 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $190 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $199 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $225 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a été préparée par dilution dans de l'eau distillée et homogénéisée par sonication pendant 45 min à 25°C .

Une série de solutions de HB2 de différentes concentrations ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $13 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $17 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $23 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $44 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $66 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $78 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a été préparée par dilution dans de l'eau distillée et homogénéisée par sonication pendant 45 min à 25°C .

Pour chaque combinaison avec les nanoparticules, deux séries de solutions ont été préparées pour lesquelles le pourcentage de chaque peptide par rapport à l'alginate a été différent. Une série de solutions a été stockée à 4°C et l'autre série de différentes solutions a été dialysée pendant 24 heures à température ambiante. A la fin de la dialyse, les solutions de chaque boudin ont été récupérées pour analyse en HPLC. Ensuite, les solutions de chaque série sont injectées dans la colonne HPLC ou l'élution a été réalisée à 215 nm et 254 nm. Pour chaque échantillon, un volume de $40 \mu\text{L}$ a été injecté dans la colonne d'HPLC. Les courbes d'étalonnage ont été obtenues par régression linéaire de la concentration de colistine, de DRS-B2 et HB2 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) par rapport à la surface du pic (**Tableau 7**) (**Annexe 3**).

Tableau 7: Courbe de calibration et régression linéaire pour les différents principes actifs.

PAM	Temps de rétention (min)	Régression linéaire ^a	κ PAM	Domaine de linéarité	R ^{2b}	Détection (nm)
DRS-B2	13.02	Y=19931X	19931	0-250 μ g.mL ⁻¹	0.9952	215
HB2	13.4	Y=23093X	23093	0-140 μ g.mL ⁻¹	0.9968	215
Colistine	9.6 et 10	Y=8248.5X	8248.5	0-100 μ g.mL ⁻¹	0.9996	215

^a Equation, où Y correspond à l'aire du pic et X à la concentration du PAM. ^b Coefficient, de corrélation (n = 10).

III-8) Préparation des solutions pour les tests microbiologiques

Des solutions des nanoparticules alginate + colistine, des nanoparticules d'alginate + DRS-B2, et des nanoparticules d'alginate + HB2 ont été préparées à différentes concentrations selon des étapes bien définies. Dans chaque solution, 1 mg de NPs d'alginate a été mélangé avec une quantité de colistine/ DRS-B2/ HB2 ou E20 bien définie. Les différentes solutions ont une concentration en nanoparticules d'alginate constante de 500 μ g/mL et différentes concentrations en colistine et les PAMs Enfin toutes les solutions ont été homogénéisées par sonication pendant 45 minutes à 25°C.

A. Préparation des mélanges de NPs alginate + colistine + petites molécules

Des solutions de nanoparticules d'alginate/colistine-petite molécule ont été préparées à différentes concentrations selon des étapes bien définies.

Dans chaque solution, la concentration des nanoparticules d'alginate était de 500 μ g.mL⁻¹ alors que les concentrations de la colistine et petites molécules (HE, polyamines et acide organiques) ont été variées.

Solutions A : Ces sont des mélanges des NPs d'alginate avec la colistine et des huiles essentielles (menthol, thymol, farnésol, géraniol et carvacrol). La concentration en colistine a été variée d'un mélange à l'autre (30 μ g.mL⁻¹, 40 μ g.mL⁻¹ et 50 μ g.mL⁻¹) en parallèle la concentration en HE a été de 10 μ g.mL⁻¹ (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Solutions des NPs alginate/ colistine /HE.

Solutions A	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉
[NPs alginate] µg.mL ⁻¹	500	500	500	500	500	500	500	500	500
[Colistine] µg.mL ⁻¹	30	40	50	30	40	50	40	40	40
[Menthol] µg.mL ⁻¹				10	10	10			
[Carvacrol] µg.mL ⁻¹							10		
[Farnésol] µg.mL ⁻¹								10	
[Géranio] µg.mL ⁻¹									10

Solutions B : Ces sont des mélanges de nanoparticules d’alginate-colistine-polyamines (spermine / pipérazine/spermidine) (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Solutions des NPs alginate/ colistine /polyamines.

Solutions B	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇
[NPs Alg]µg.mL ⁻¹	500	500	500	500	500	500	500
[Colistine] µg.mL ⁻¹	40	40	40	30	40	20	10
[Spermine]µg.mL ⁻¹		20					
[Piperazine]µg.mL ⁻¹			20				
[Spermidine]µg.mL ⁻¹				20	30	40	50

Solutions C : Deux solutions des NPs alginate-colistine-acide lactique ont été préparées, dont la concentration de la colistine a été variée entre de 30 µg.mL⁻¹, 40 µg.mL⁻¹ tandis que la concentration en acide lactique a été de 15 µg.mL⁻¹.

Solutions D : Ces sont des solutions de NPs d’alginate-colistine-E20. La concentration de la colistine et d’E20 a été différente selon les conditions des tests.

Toutes les solutions ont été préparées à pH 5 et homogénéisées par sonication pendant 45 minutes à 25°C (**Tableau 10**).

Les solutions D ont été préparées dans un tampon acétate 0.2M de pH 5 car l’E20 est actif à pH5 par contre les solutions A, B, et C ont préparées dans l’eau stérile à pH7, et ils ont été homogénéisés par sonication pendant 45 minutes à 25 °C.

Tableau 10 : Solutions des NPs alginate/ colistine /E20.

Solutions D	D₁	D₂	D₃	D₄	D₅	D₆
[NPs alginate] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500	500	500			
[Colistine] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	20	30	40	20	30	40
[E20] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40	30	20	40	30	20

B. Préparation des mélanges des NPs alginate + PAMs avec des HE et des Acide organiques

Des différentes solutions des nanoparticules d'alginate avec des PAMs (DRS-B2/ HB2 ou E20) ont été préparées en combinaison avec des huiles essentielles, des acides organique à différents pH (**Tableau 11,12 et 13**).

Solutions E : Ce sont des solutions des nanoparticules d'alginate-E20. Elles ont été préparées dans un tampon acétate 0.2 M à pH 5 avec un pourcentage de 10% ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de E20 par rapport à la quantité des NPs d'alginate, et un pourcentage de 2% ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) pour chaque huile essentielle (menthol, thymol et α -pinène), et 0.2% ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) pour chaque acide organique (lactique/ citrique/ sorbique/ formique et propionique) (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Solutions des NPs alginate + E20 + HE / acide organique

Solutions E	E₁	E₂	E₃
[NPs Alg] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500	500	500
[E 20] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	60	50	60
[HE] $\mu\text{g.mL}^{-1}$		10	
[A. Organique] $\mu\text{g.mL}^{-1}$			1

Solutions F : Les solutions de cette famille ont été préparées à pH 7 et sont à la base de peptide DRS-B2 (**Tableau12**).

Tableau 12: Solutions des NPs alginate + DRS-B2 + menthol /Acide lactique.

Solution F	[DRS-B2] µg.mL⁻¹	[NPs Alg] µg.mL⁻¹	[A. lactique] µg.mL⁻¹	[HB2] µg.mL⁻¹	[Menthol] µg.mL⁻¹
F₁	125				
F₂	125	500			
F₃	125		1		
F₄	125				10
F₅	125	500			10
F₆	125	500	1		
F₇	60			60	
F₈	60	500		60	
F₉	30			30	
F₁₀	30	500		30	
F₁₁	40	500			
F₁₂	40	500			
F₁₃	40	500			10
F₁₄	40	500	1		
F₁₅	40	500		40	10
F₁₆	40	500	1	40	
F₁₇	30	500			10
F₁₈	30	500	1		
F₁₉	30	500		30	10
F₂₀	30		1	30	

Solutions G : Ces solutions sont préparées avec le peptide HB2 en combinaison avec le menthol / acide lactique (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Solutions des NPs alginate + HB2 + menthol /Acide lactique.

Solution G	[HB2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 1	[NPs Alg] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	[A. lactique] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	[DRS-B2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	[Menthol] $\mu\text{g.mL}^{-1}$
G₁	125				
G₂	125	500			
G₃	125		1		
G₄	125				10
G₅	125	500			10
G₆	125	500	1		
G₇	60			60	
G₈	60	500		60	
G₉	30			30	
G₁₀	30	500		30	
G₁₁	40	500			
G₁₂	40	500			
G₁₃	40	500			10
G₁₄	40	500	1		
G₁₅	40	500		40	10
G₁₆	40	500	1	40	
G₁₇	30	500			10
G₁₈	30	500	1		
G₁₉	30	500		30	10
G₂₀	30		1	30	

III-9) Préparation de cellules eucaryotes pour la cytotoxicité

Les cellules eucaryotes cibles (Caco-2 /HT-29) sont cultivées en milieu DMEM en flasque de 75 cm² pendant 6 à 7 jours. Après récupération des cellules et comptage sur lame de Malassez, 8000 cellules sont déposées dans chaque puits d'une plaque 96 puits dans un volume final de 200 μL de DMEM. Après incubation à 37°C à 5% de CO₂ pendant 7 jours, les cellules sont à confluence et prêtes à l'utilisation.

Les solutions pour les tests de la cytotoxicité sur les deux lignées cellulaires HT-29 et IPEK-1 ont été préparées dans des solutions de DMEM dans un environnement stérile sous la

PSM (poste de sécurité microbiologique) pour éviter tout risque de contamination pouvant altérer les résultats de nos tests. Des poudres des NPs d'alginate ont été mélangées avec la colistine et les petites molécules dans des solutions de DMEM puis homogénéiser par sonication pendant 15 minutes 25°C.

III-10) Préparation de la culture bactérienne

Pour tout test, nous réalisons au préalable une pré-culture. Cette étape permet l'obtention d'une quantité suffisante de bactéries pour les essais à réaliser. Pour ce faire, nous préparons une solution avec la souche de bactérie d'intérêt (*E. coli*) dans un milieu de culture favorable à sa croissance comme le milieu BHI.

Au préalable, la souche bactérienne *E. coli* était conservée et maintenue dans un mélange de milieu nutritif BHI et de glycérol à 50% et stockée à -20°C. La veille des manipulations, une aliquote est prélevée etensemencée dans 15 mL de BHI, le tout est maintenu à 37°C pendant 18 heures.

- **Préparation des culots bactériens**

Pour l'imagerie MEB, un culot bactérien a été préparé au préalable. 1 mL a été prélevé du milieu de culture dans un tube eppendorf de 2 mL. Une centrifugation pendant 5 minutes à 8000 rpm a été effectuée pour la séparation des cellules bactériennes du surnageant. Après la centrifugation et prélèvement du surnageant par pipette pasteur, 1 mL d'eau ultra pure salin a été ajouté pour une deuxième centrifugation pendant 5 minutes à 8000 rpm. Enfin, le surnageant a été prélevé et 1 mL de la solution de NPs alginate-Rhodamine B a été ajouté pour une incubation de 18 h à 37°C.

III-11) Préparation des solutions pour l'imagerie MET

Cette méthode a été effectuée en deux étapes pendant deux jours.

- **Première étape** : Préparation des culots bactériens (**Figure 37**).

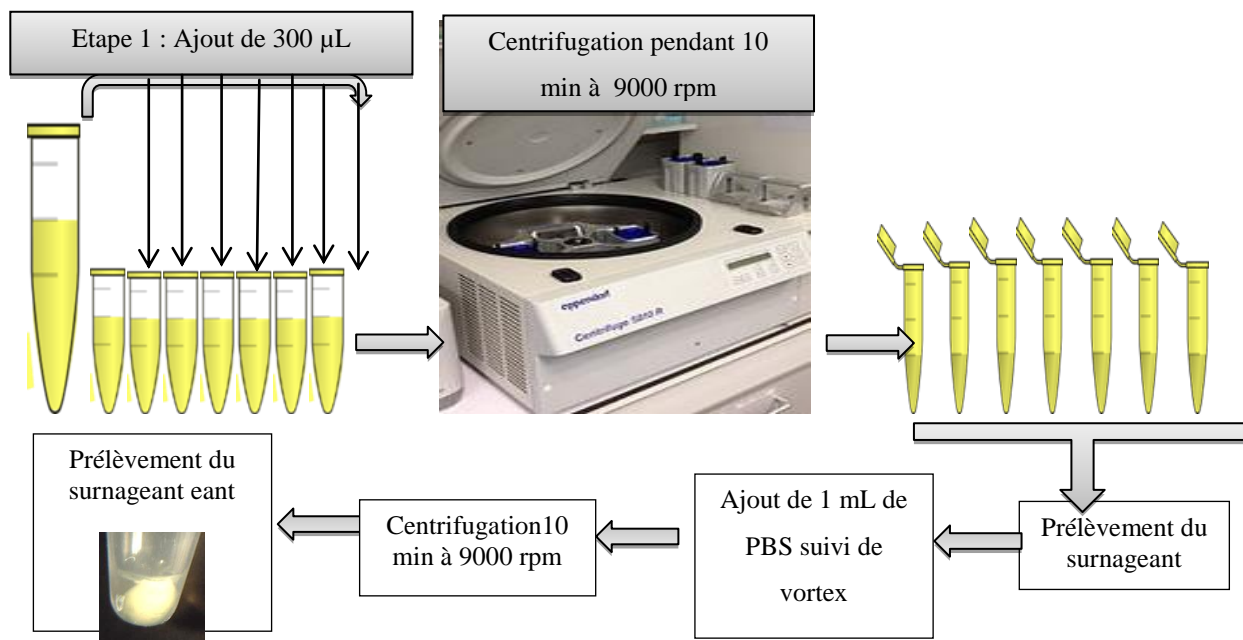


Figure 37 : Préparation des culots bactériens.

Une plaque de 96 puits a été préparée (un jour avant) pour déterminer la CMI des différentes solutions antibactériennes, on a prélevé les solutions des cupules d'où il y a une inhibition de la croissance bactérienne pour chaque solution. On a déterminé la CMI des 7 solutions (NPs Alg [$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$] ; Colistine [$64 \mu\text{g.mL}^{-1}$] ; NPs Alg [$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$] + Colistine [$40 \mu\text{g.mL}^{-1}$] +Menthol [$10\mu\text{g.mL}^{-1}$] ; NPs Alg [$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$] +Colistine[$40 \mu\text{g.mL}^{-1}$] +Acide lactique [$15\mu\text{g.mL}^{-1}$] ; NPs Alg [$500\mu\text{g.mL}^{-1}$] +E20 [$64 \mu\text{g.mL}^{-1}$] ; E20et NPs Alg [$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$] +Colistine [$40 \mu\text{g.mL}^{-1}$]). Enfin, on a incubé tous les tubes pendant 18 heures à 37°C (Culot bactérien + les solutions des puits de la CMI). Les pourcentages de menthol et de l'acide lactique ont été déterminés suite aux résultats de la cytotoxicité (Réf : partie résultats).

- **Deuxième étape** : Fixation des culots bactériens et incubation à 4°C .

Une solution de BSA (albumine de sérum bovin) a été préparée par dissolution de 450 mg dans 30 mL de PBS, cette solution a été utilisée pour rincer des tubes eppendorf et les cônes ; la BSA a été utilisée pour former une couche permettant d'éviter l'attachement des cellules bactériennes sur la paroi des tubes.

Après 18 heures d'incubation, les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 9000 rpm, ensuite les surnageants ont été prélevés et 1 mL de PBS a été ajouté dans chaque tube pour récupérer les culots de chaque solution et les verser dans des tubes rincés avec la BSA. Les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 9000 rpm pour prélever le surnageant ; rajouter 250 μ L de la solution de fixation, le glutaraldéhyde, qui permet la fixation des cellules bactériennes. Enfin tous les tubes ont été incubés à 4°C pour l'imagerie en microscopie électronique en transmission (MET).

IV) Méthodes de caractérisation du matériel biologique

IV-1) Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)

La distribution de taille (diamètre moyen et indice de polydispersité) et la mobilité électrophorétique des dispersions de nanoparticules ont été mesurées en utilisant un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). Les mesures ont été effectuées à 25°C avec un angle fixe de 173°. Les tailles indiquées sont la moyenne du diamètre des nanoparticules (nm). Le diamètre est calculé à partir de la fonction de corrélation de l'intensité de la lumière diffusée par les nanoparticules, assimilées à des sphères équivalentes. L'indice de polydispersité (Pdl) correspond à la mesure de l'homogénéité de la dispersion, sa valeur est comprise entre 0 et 1 (dispersion homogène).

Le potentiel Zêta représente la charge de surface des nanoparticules dispersées dans une solution. Il traduit la mobilité électrophorétique d'une suspension chargée dans un champ électrique. Il est mesuré en utilisant le mode électrophorétique du Zetasizer.

Une solution de nanoparticules d'alginate (500 μ g.mL⁻¹) a été préparée sous ultrasons pendant une heure à 25°C. Un échantillon de 1 mL a été placé dans la cellule d'analyse. Les paramètres suivants sont utilisés : Température d'analyse : 25°C ; solvant : eau ; durée des acquisitions = 5 secondes. Pour chaque échantillon analysé, le diamètre des particules, les profils d'autocorrélation, les histogrammes de dispersion de tailles (intensité en fonction du diamètre), le pourcentage de polydispersité (%Pd), la charge de surface, la conductivité et la déviation de zêta ont été vérifiés. Les mesures sont réalisées en triplicat.

IV-2) Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les propriétés thermiques des nanoparticules d'alginate ont été évaluées par analyse thermogravimétrique avec l'appareillage suivant : NETZSCH TG 209 F3. L'analyse s'est

déroulée de 20 à 1000 °C et l'augmentation de la température s'effectuait de manière continue à la vitesse de 10 °C/min sous un flux d'azote.

IV-3) Spectrophotomètre UV-Visible

Les mesures spectroscopiques UV-Vis ont été effectuées sur un spectrophotomètre à double faisceau Perkin-Elmer Lambda 950 fonctionnant à une résolution de 1 nm. Les spectres d'absorption UV-Vis ont été enregistrés dans des cellules de quartz de longueur de trajet de 1 cm entre 200-600 nm. Les solutions de tous les échantillons (NPs alginate+ Rhodamine B avant dialyse et après dialyse), analysés ont été préparées à une concentration en nanoparticules d'alginate égale à 0.5 mg.mL⁻¹ dans de l'eau milli-Q. Elles étaient toutes homogènes. Pour effectuer une mesure, la solution est introduite dans une cuve en quartz bien propre puis placée dans l'appareil avec en parallèle une autre cuve contenant uniquement le solvant de préparation. Les spectres sont enregistrés entre 200 et 600 nm. Le but de cette mesure est de déterminer si la rhodamine B (rouge) est adsorbé a la surface des nanoparticules d'alginate.

IV-4) Spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) ont été enregistrés à l'aide d'un ThermoScientific FTIR (Nicolet 8700) avec une résolution spectrale de 4 cm⁻¹. 1 mg de NPs d'alginate a été mélangé avec 175 mg de poudre de KBr dans un mortier d'agate. Le mélange a été pressé dans une pastille sous une charge de 10 tonnes pendant 2 à 4 min et le spectre a été enregistré immédiatement. Un total de 16 balayages cumulatifs a été recueilli. Le signal d'une pastille de KBr pure a été soustrait en tant qu'arrière-plan.

IV-5) Analyse par microscopie

IV-5-1) Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Les mesures au MEB ont été effectuées à l'aide d'un microscope électronique ULTRA 55 (Zeiss, München, Allemagne), équipé d'un émetteur d'émission de champ thermique, de trois détecteurs différents (détecteur EsB avec grille de filtrage, détecteur SE à lentille intégrée à haute efficacité, détecteur électronique secondaire Everhart-Thornley) et d'un dispositif EDX. Cette technique a été utilisée pour analyser les suspensions de NP d'alginate. Les paramètres du microscope ont été fixés comme suit : tension d'accélération des électrons = 200 V-20 KV ; distance de travail = 1 mm ; résolution sub-nanométrique à 15 kV ; courant du faisceau

jusqu'à 100 nA. L'échantillon a été préparé en déposant plusieurs gouttes de la solution aqueuse de NPs d'alginate ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sur un substrat de silicium (préalablement nettoyé dans des bains successifs d'acétone, d'isopropanol et aux ultrasons pendant 10 min, puis rincé abondamment à l'eau MQ). Ensuite le substrat a été séché à 100°C pendant 1 h.

IV-5-2) Microscope confocal (droit)-NIKON-A1-R

Un microscope confocal (réflexion ou fluorescence) est un microscope photonique qui permet d'obtenir des images de fluorescence multidimensionnelles d'un échantillon étudié. L'incorporation de la RhB dans les nanoparticules d'alginate a été mise en évidence par émission de fluorescence à 590 nm par le microscope confocal droit, Nikon A1R, équipé d'un détecteur de 32 canaux et possède une platine fixe dédiée à la recherche en électrophysiologie.

IV-5-3) Microscopie à fluorescence-LEICA-AF6000-LX

La microscopie à fluorescence est une technique de microscopie optique très utilisée en biologie. En plus de l'observation classique par réflexion et/ou absorption de la lumière visible, elle tire profit du phénomène de fluorescence. Un marqueur fluorescent (rhodamine, FITC...) est couplé à la molécule ou polyélectrolyte que l'on souhaite observer (fluorescence secondaire). Au cours de cette thèse, les images de microscopie à fluorescence ont été réalisées avec un microscope à fluorescence LEICA-AF6000-LX équipé d'une caméra Andor iXon 885 utilisant un objectif à immersion dans l'huile (objectif $100\times$; 1,4 NA). Le signal de fluorescence a été acquis en utilisant un ensemble de filtres d'excitation et d'émission à double bande. Toutes les images ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Leica LAS AF Lite. Cette technique a été utilisée pour analyser l'interaction entre les suspensions bactériennes et les nanoparticules d'alginate. Une solution de 1 mL de nanoparticules d'alginate-Rhodamine B (dialysée pendant 24 h) est versée dans un tube eppendorf contenant du culot bactérien *E. coli* 184 (mcr-1+) et incubée à 37°C pendant 18 h. Ensuite, 4 μL de la suspension de bactéries marquées par la RhB ont été déposés entre une lame de verre et une lamelle. Une solution de glutaraldéhyde (2,5% dans PBS) a été utilisée pour fixer les cellules bactériennes dans l'obscurité.

IV-5-4) Microscope Electronique en Transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission (MET) permet l'obtention des informations structurales et morphologiques des matériaux par imagerie. Un faisceau d'électrons, focalisé par des lentilles électromagnétiques, passe au travers de l'échantillon d'une épaisseur inférieure à 100 nm. Le microscope électronique en transmission utilisé est le JEOL JEM-2100FX avec une tension d'accélération de 200 kV, équipé d'une caméra GATAN CCD Orius 1000 et d'une caméra GATAN CCD Orius 200D. Cette technique est conçue pour faciliter l'analyse structurale au niveau atomique dans les domaines scientifiques tels que la biologie, la médecine, et les matériaux. Il a été développé pour obtenir une grande qualité d'image ainsi que de grandes performances analytiques à 200 kV avec une taille de sonde inférieure à 0.5 nm. Les échantillons destinés à la MET ont été préparés en déposant 5 µL de l'échantillon bactérien sur un film Formvar sur 300 mailles carrées, grille de nickel (EMS FF300-Ni).

V) Méthodes d'analyse du matériel biologique

V-1) Spectrométrie de masse MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization masse spectrometry)

C'est un spectromètre de masse qui est composé de 3 éléments : une source d'ions (MALDI), une séparation des molécules (TOF) et la détection. Les spectres de masse MALDI ont été enregistrés sur un instrument Bruker Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) équipé d'un analyseur TOF et d'un module LIFT. Un laser Smartbeam II 2 kHz pulsé à une longueur d'onde de 355 nm (+3,49 eV) a été opéré à une fréquence de 1000 Hz (données MS) avec un temps d'extraction retardé de 130 ns. La source a été exploitée en mode positif. Une tension d'accélération de 25,0 kV (IS1) a été appliquée pour une accélération finale de 21,95 kV (IS2).

Le mode linéaire et réflectron positif a été utilisé pour les peptides. L'irradiation laser aléatoire a été effectuée selon le mode d'échantillonnage partiel avec 10 coups par point. Les ions ont été détectés sur différentes gammes de masse, selon les échantillons analysés. Les données ont été acquises en utilisant le logiciel FlexControl et traité à l'aide de Flex Analysis Logiciel.

La gamme de masse utilisée pour l'analyse des peptides était de 100 à 1000 m/z. Des plages et des paramètres similaires ont été utilisés pour d'autres molécules. Le rapport signal sur bruit (S / N) a été fixé à 3 minimum. Tous les pourcentages laser représentent la valeur

absolue du laser et non la puissance laser relative présentée dans l'interface graphique du logiciel FlexControl 3.4.software.

- **Dépôt d'échantillons et mesure par spectrométrie de masse**

Les détails de la préparation de l'échantillon sont décrits dans l'ESI. La méthode de dépôt est la suivante : Des gouttelettes de 0,5 µL ont été coulées à au moins 3 endroits différents sur 3 surfaces CNW (carbon nanowalls) et ont été laissées sécher à l'air pendant 1 h. Ensuite, les CNW ont été fixés avec un ruban adhésif double face conducteur de carbone sur un adaptateur MTP TLC (Bruker). La plaque a ensuite été introduite dans la source d'ions du spectromètre de masse. La calibration externe a été réalisée en utilisant des mélanges de peptides du commerce.

V-2) HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) est une technique de séparation et d'analyse d'un ou plusieurs composés d'un échantillon. Elle se compose d'une phase mobile liquide (l'éluant) et d'une phase stationnaire (la colonne chromatographique). Le principe est la séparation des composés selon leur affinité et leur interaction avec la phase stationnaire constituée d'un support de gel. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

L'appareil utilisé dans notre laboratoire est le Shimadzu LC2010-HT (Shimadzu, Tokyo, Japon) avec une colonne C4 de 5 µm QS Uptisphere ® 300 Å, 250 x 4,6 mm (Interchim, Montluçon, France). Le détecteur est un détecteur UV. La phase mobile est composée d'un mélange d'éluant A (acide trifluoroacétique à 0,1% dans de l'eau déionisée) et d'éluant B (acide trifluoroacétique à 0,1% dans de l'acétonitrile) à un débit de 1 mL / min. La colonne est chauffée à 40 °C et l'élution des composés s'effectue selon un gradient linéaire de 0 à 80% en 30 minutes. Les échantillons à analyser (partie III-7, p 132-133) ont été filtré à travers une membrane de cellulose régénérée de 0,45 µm avant de charger la colonne (volume injecté = 40 µL). La détection a été effectuée à 215 et 254 nm.

V-3) Test de dosage des protéines bactériennes

Le dosage de protéines bactériennes a été fait selon le protocole **QuantiPro™ BCA Assay Kit** décrit par Sigma Aldrich (numéro de catalogue QPBCA).

- **Préparation des culots bactériens**

Six tubes de 2 mL contenant la culture bactérienne *E. coli* 184 ont été centrifugés à 9000 rpm pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer le surnageant de chaque tube et ajouter 1 mL de PBS (pH7) pour centrifuger à nouveau dans les mêmes conditions comme une étape de lavage des culots bactériens. Prélèvement du surnageant suivi d'un ajout de 1 mL de chaque solution (NPs Alg [500 µg.mL⁻¹], Colistine [64 µg.mL⁻¹], E20 [15 mg.mL⁻¹], NPs Alg/Colistine [500 µg.mL⁻¹ : 64 µg.mL⁻¹], NPs Alg/E20[500 µg.mL⁻¹ : 64 µg.mL⁻¹] et incubation à des intervalles du temps différents (1 h, 3 h et 5 h). A la fin de l'incubation, une étape de centrifugation est nécessaire pour prélever les surnageants et les stocker à -20°C pour le lendemain.

- **Préparation d'une solution standard de protéines**

Une série de solutions d'albumine de sérum bovin (BSA) de différentes concentrations a été préparée pour la détermination de la courbe d'étalonnage. Une solution mère de BSA de 50 µg.mL⁻¹ a été préparée selon le protocole **QuantiPro™ BCA Assay Kit**. Six tubes eppendorf de 2 mL ont été préparés dans le PBS stérile contenant la BSA (0 à 30 µg.mL⁻¹).

- **Préparation de réactif QuantiPro (QA+QB+QC)**

Selon le protocole **QuantiPro™ BCA Assay Kit**, la préparation de réactif dépend du nombre d'échantillons de protéines à analyser. Le volume de réactif de travail QuantiPro à préparer est fonction du nombre de blancs, d'étalons de protéines et d'échantillons inconnus à analyser. Ce réactif est préparé en mélangeant 14,5 mL de QA avec 14,5 mL de QB et 0,6 mL de QC et il doit être préparé 10 min avant la réaction de coloration.

- **Dosage des protéines par spectrophotomètre**

Un volume de 0.5 ml d'échantillon de protéine inconnu est mélangé avec 0.5 mL de réactif QuantiPro et incubé pendant 1 h à 60°C. Après incubation, une lecture par spectrophotomètre à 562 nm a été effectuée pour mesurer l'absorbance de chaque solution protéique et de la gamme étalon afin de tracer la courbe d'étalonnage et déterminer la quantité de protéine de chaque solution.

V-4) Méthodes microbiologiques

V-4-1) Tests antibactériens

Il existe trois méthodes pour déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à un agent antimicrobien : la diffusion en disque (Agar diffusion test), la dilution liquide et la dilution solide. Ces trois méthodes permettent de déterminer les diamètres des halos d'inhibition, la concentration minimale d'inhibition (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

V-4-2) Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu solide

L'évaluation de l'activité antibactérienne est réalisée d'abord par la méthode de diffusion en milieu gélose en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries (390). Elle consiste à déposer à l'intérieur d'un puits creusé dans une gélose inoculée dans la masse par une souche bactérienne cible, une quantité de 50 µL de substance antimicrobienne à évaluer. Après dépôt dans le puits, les boîtes sont laissées à 4°C pendant 1 h pour permettre une pré-diffusion du contenu de chaque puits, puis incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. Pendant l'incubation, les composés diffusent dans la gélose et inhibent la formation d'un tapis bactérien selon le gradient de concentration qui se met en place. Cette diffusion est dépendante de la diffusibilité du composé dans la gélose, de la durée de migration, de la distance de migration et de la concentration du composé. En fonction du gradient de concentration établi par les composés dans la gélose, une inhibition de croissance microbienne est induite. L'activité antibactérienne est mise en évidence par la présence d'un halo d'inhibition dont le rayon est proportionnel à la concentration en produit actif. Le diamètre d'un halo d'inhibition quantifie l'activité antimicrobienne de l'extrait ou du composé. Le test est répété 2 fois pour confirmer les résultats.

V-4-3) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par microdilution en milieu liquide

Cette méthode a pour objectif de déterminer la CMI d'un antibiotique pour une bactérie donnée. Le principe de la technique est relativement simple : Il s'agit de mettre en contact une concentration décroissante d'antibiotique avec un inoculum bactérien calibré (391). Les différents échantillons sont préalablement dissouts dans l'eau distillée stérile. Ensuite, une série de dilution au ½ est réalisée dans les différents puits d'une plaque 96 puits, puis

supplémentés de BHI pour un volume final de 250 μL dans chaque puits. Puis, une suspension du microorganisme est introduite dans les puits au-dessus des différentes concentrations des solutions antibactériennes. Après une incubation de 24 h à 37°C, la CMI est déterminée en fonction du trouble observé dans la cupule. Si le mélange est trouble, les bactéries se sont développées ; s'il est clair, les colonies bactériennes ne se sont pas développées. La CMI devient la plus faible concentration d'antibiotique des cupules où le mélange est resté clair

La lecture peut être visuelle ou confirmée par spectrophotométrie à une longueur d'onde entre 600 et 630 nm. La méthodologie d'incubation est la suivante :

- Ajout de 125 μL d'eau distillée stérilisée dans chaque puits de A à H et de 0,2 3,...à 12.
- Ajout de 250 μL de la solution antibactérienne (10^7 souches/puit) dans les puits de la colonne 2.
- On fait une dilution de $\frac{1}{2}$ de chaque puits, c'est-à-dire qu'à partir du puits 2 on prélève 125 μL de la solution antibactérienne qu'on transfère dans le puits 3 qui contient déjà 125 μL d'eau distillée stérile. On obtient alors la concentration de $\frac{1}{2}$ dans le puits 3. L'opération est répétée pour tous les puits jusqu'au dernier pour lequel on prélève un volume de 125 μL en excès qu'on élimine.
- Après on ajoute dans chaque puits (1 à 12) 125 μL de BHI (contenant la souche bactérienne), alors le volume total dans chaque puits sera 250 μL ; dans le 0 on a 125 μL d'eau + 125 μL de souche bactérienne.
- Incubation pendant 24 h à 37°C sans agitation.
- Après 24 h d'incubation, des différentes CMI sont déterminées pour chaque plaque pour les différentes NPs.

Plus la CMI est petite plus la souche est sensible, et inversement plus la CMI est grande plus la souche est résistante.

V-4-4) Détermination de la CMB en milieu solide

La CMB est définie comme la plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 24 h d'incubation à 37°C. Elle correspond à une activité antibactérienne égale à 99,99%. La méthode de dilution suivie de la méthode de comptage est dans ce cas utilisée. Les CMBs sont déterminées par dépôt sur

gélose de BHI Agar du contenu (100 μ L) des premiers puits où aucune croissance bactérienne n'est observée (valeur de la CMI). La procédure est répétée pour les puits de la concentration supérieure. Les géloses sont incubées à 37°C pendant 24 h. Ensuite, nous avons compté le nombre de bactéries vivantes pour chaque cupule. La concentration de la cupule qui aura moins de 0,01% de bactéries viables par rapport à l'inoculum initial, c'est-à-dire la plus faible concentration tuant 99,99% des micro-organismes en culture sur ce milieu correspond à la CMB.

V-4-5) Courbe de cinétique de la mortalité

Cette méthode est peu utilisée car elle demande beaucoup de temps. En effet, il s'agit de compter le nombre de colonies viables à différents moments, en présence d'une combinaison d'antibactériens. Il s'agit donc d'une méthode dynamique. Cette technique permet de mettre en évidence la viabilité dans le temps de colonies bactériennes en présence de composés antibactériens à une concentration donnée et ainsi de déterminer le mode d'action du composé actif. Le dénombrement des UFC/mL sur la période d'incubation permet de déterminer si le composé antibactérien agit par destruction bactérienne (bactéricide) ou sur la multiplication des cellules en entraînant un ralentissement de croissance (bactériostatique). Une préculture bactérienne en phase finale de croissance exponentielle (10^7 UFC/mL) est inoculée à raison de 10^6 UFC/mL dans 10 mL du milieu de culture des bactéries (BHI), puis incubée à sa température optimale de croissance, en présence de composés antibactériens en concentrations équivalentes à la valeur de la CMI. L'énumération des bactéries survivantes après inoculation et prélèvement à différents intervalles de temps, sont réalisés par des étalements en boîtes de Pétri sur un milieu gélosé à l'aide d'un étaloir. Plusieurs dilutions (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) sont nécessaires avant l'étalement, afin d'obtenir après 24 h de croissance des colonies dénombrables. Les dilutions de 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} sont effectuées sur une plaque de 96 puits à chaque prélèvement pour chaque culture avant l'étalement.

- Ajout de 270 μ L d'eau stérile dans les puits 2 à 10.
- Prélèvement de 100 μ L de la culture bactérienne après chaque incubation et l'ajout dans le puits 1.
- On fait une dilution de 1/10 de chaque puits, c'est-à-dire qu'à partir du puits 1 on prélève 30 μ L de la solution antibactérienne qu'on transfère dans le puits 2 qui contient déjà 270 μ L d'eau distillée stérile. On obtient alors la concentration de 1/10

dans le puits 2. L'opération est répétée pour tous les puits jusqu'au dernier puits dans lequel on arrive à une dilution de 10^{-11} .

- Un volume de 100 μ L d'inoculum bactérien dilué est alors prélevé à l'aide de la pipette stérile afin de le déposer sur la surface de milieu gélosé et l'étaler.
- Le dénombrement bactérien est réalisé après 24 h d'incubation. La destruction ou l'inhibition de croissance bactérienne est mesurée par évaluation du nombre de Log d'UFC/ml obtenu après le temps d'incubation.

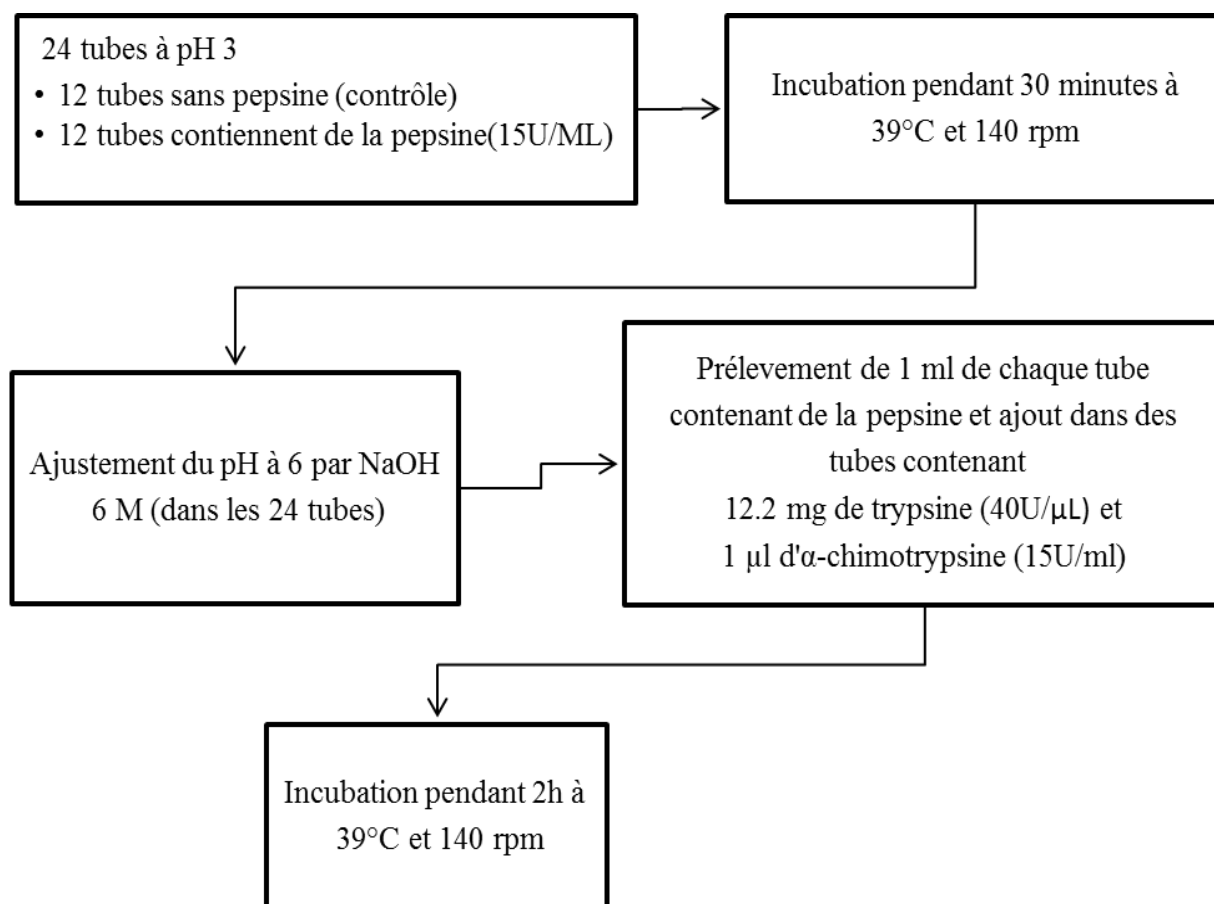
V-4-6) Test de cytotoxicité

Les cellules IPEC-1/HT-29 sont cultivées en adhérence dans des flasques en plastique en présence d'un milieu nutritif (5 ou 10 mL pour les flasques de 25 ou 75 cm², respectivement). Le milieu est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Minimum medium, Invitrogen, France) complet. Il sera caractérisé de "milieu complet" dans la suite. Ce milieu est préchauffé à 37°C avant d'être mis au contact des cellules. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide, composée de 95% d'air et de 5% de CO₂ et se divisent en mono couche jusqu'à confluence. Elles sont repiquées environ une fois par semaine : Après le retrait du milieu et le rinçage des cellules au PBS 1 \times (Phosphate Buffer Saline, Invitrogen, France), les cellules sont récupérées et comptées sur lame de Malassez, 8000 cellules sont déposées dans chaque puits d'une plaque 96 puits dans un volume final de 200 μ L de DMEM. Après incubation à 37°C, 5% CO₂ pendant 7 jours les cellules sont à confluence et prêtes à être utilisées. Les échantillons à tester sont préparés en milieu DMEM à la concentration désirée (cf tests d'activité et CMI), puis mis en contact pendant 24 h avec les tapis cellulaires après lavage des puits. Les contrôles négatifs contenant le milieu DMEM seul, ne contenant donc pas d'échantillons, sont incubés dans les mêmes conditions, chaque test étant répété dans 3 puits distincts. Un contrôle de cytotoxicité est également réalisé dans ces mêmes conditions, consistant en un milieu DMEM contenant 0,1% de Triton X100 (un détergeant puissant). Après incubation, les échantillons sont retirés des puits et un mélange de DMEM contenant le réactif CCK8 à 5% du volume final est ajouté dans chaque puits, à raison de 200 μ L par puits. Ce réactif permettant de mettre en évidence l'activité déhydrogénase des cellules IPEC-1/HT-29 viables. Après 2 h d'incubation, la lecture de la plaque 96 puits est effectuée à une longueur d'onde de 450 nm avec un lecteur de microplaque SAFAS (Monaco). Les résultats sont alors enregistrés puis traités et exprimés en pourcentage d'activité mesurée des contrôles non traités avec les différents échantillons.

V-4-7) Traitement enzymatique

Avant de commencer par ce test, une petite introduction générale sur le système digestif du porc. Le système digestif chez le porc débute par la bouche avec une première action de digestion effectuée par la sécrétion de l'amylase par les glandes salivaires, ensuite les aliments transitent par l'œsophage pour atteindre l'estomac dont le pH est très acide (inférieur à 3) et que ses cellules produisant des enzymes telles que la lipase gastrique, la pepsine ou la trypsine. Après la digestion est complétée par deux organes annexes au transit digestif (le foie et le pancréas) qui produisent aussi des enzymes se déversant dans le duodénum à la sortie d'aliments prédigérés qui vont atteindre l'intestin qui est le lieu principal de la digestion dont le pH varie entre 6 et 8. Le temps de transit dans l'intestin grêle dure entre 2 et 6 h chez le porc adulte.

Dans ce paragraphe, on a essayé de déterminer l'effet des enzymes digestives sur l'activité des NPs alginate /colistine, NPs alginate/DRS-B2 et NPs alginate/E20% avec l'acide lactique ou les huiles essentielles sur *E. coli* 184. On a préparé 12 solutions à différents pH, pour chaque solution deux tubes eppendorf de 2 mL. 12 tubes « contrôle" sans ajout de la pepsine, de la trypsine et d' α -chymotrypsine et 12 tubes avec des enzymes.



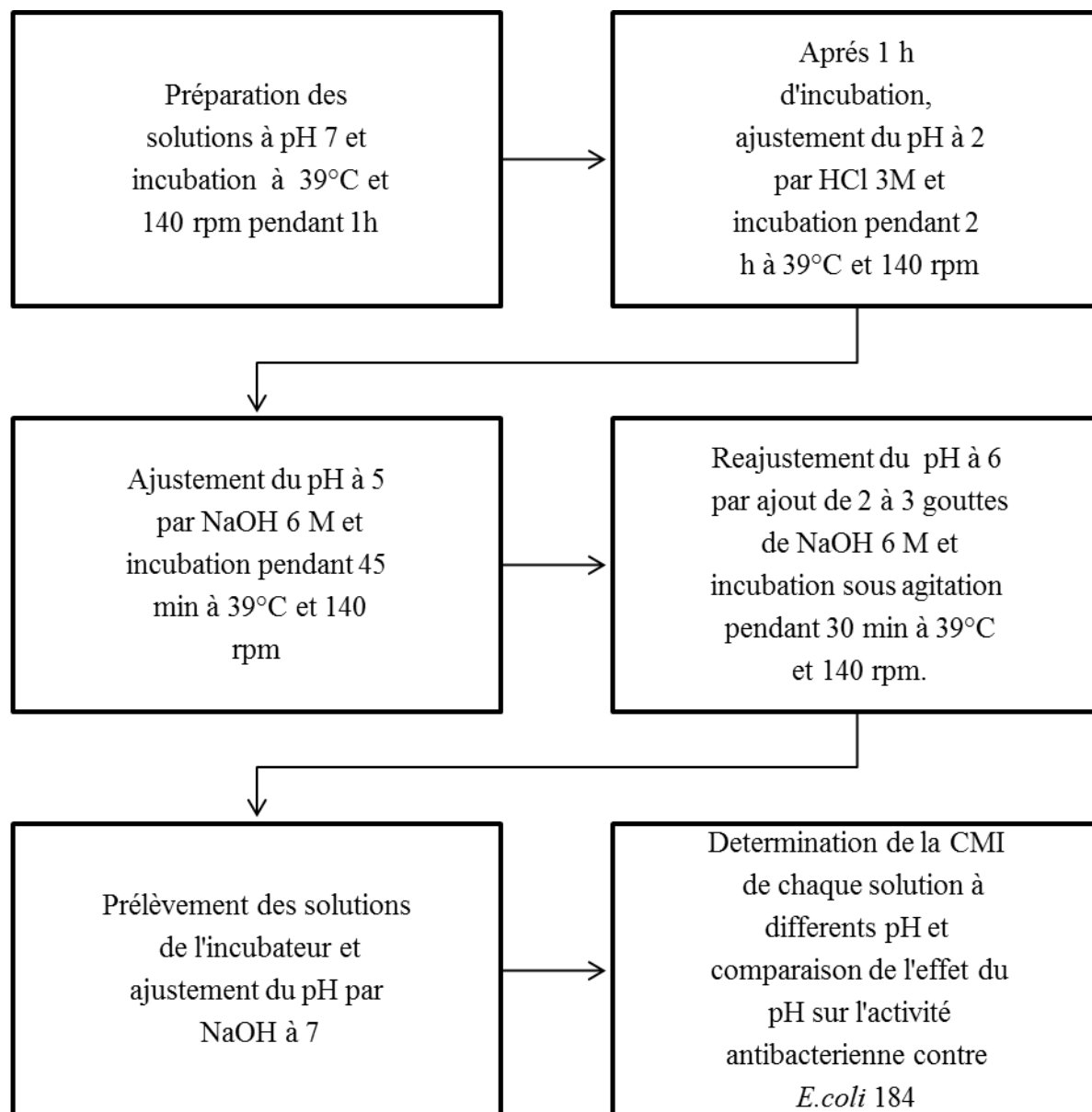
V-4-8) Traitement à différents pH

Deux séries de solutions (A et B) ont été préparées avec des nanoparticules d'alginate ($500\mu\text{g.mL}^{-1}$). Une série de combinaison des NPs d'alginate avec la colistine et l'acide lactique ou le menthol et l'autre série de solutions a été préparée avec le peptide antimicrobien DRS-B2.

Série A : NPs alginate [$500\mu\text{g.mL}^{-1}$] /colistine [$40\mu\text{g.mL}^{-1}$] ; NPs alginate [$500\mu\text{g.mL}^{-1}$]/ colistine [$40\mu\text{g.mL}^{-1}$]/menthol [$10\mu\text{g.mL}^{-1}$]; NPs alginate [$500\mu\text{g.mL}^{-1}$]/colistine [$40\mu\text{g.mL}^{-1}$] /acide lactique [$1\mu\text{g.mL}^{-1}$] et une solution de colistine [$40\mu\text{g.mL}^{-1}$].

Série B : NPs alginate [$500\mu\text{g.mL}^{-1}$] /DRS-B2 [$40\mu\text{g.mL}^{-1}$] ; NPs alginate [$500\mu\text{g.mL}^{-1}$]/ DRS-B2 [$40\mu\text{g.mL}^{-1}$]/menthol [$10\mu\text{g.mL}^{-1}$]; NPs alginate [$500\mu\text{g.mL}^{-1}$]/DRS-B2[$40\mu\text{g.mL}^{-1}$] /acide lactique [$1\mu\text{g.mL}^{-1}$] et une solution du peptide DRS-B2 [$40\mu\text{g.mL}^{-1}$].

Série C : NPs alginate [500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] /E 20 [60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] ; NPs alginate [500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] /E 20 [50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]/menthol [10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; NPs alginate [500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]/E20[50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]/thymol [10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]NPs alginate [500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]/E 20 [60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] /acide lactique [1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] et une solution de E 20 [60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$].



PARTIE IV : Résultats et Discussion

I) Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'alginate

I-1) Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)

Les nanoparticules d'alginate ont été caractérisées de manière générale en termes de taille (diamètre hydrodynamique moyen) et de charge de surface (potentiel zêta). Deux méthodes permettant de déterminer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules. La première méthode utilise le principe de Diffusion Dynamique de la Lumière (ou DLS, Dynamic Light Scattering). Elle est employée pour mesurer la taille des particules d'alginate et le potentiel zêta de ces particules. Elle peut analyser une grande quantité de particules et permet donc de détecter l'éventuelle présence d'agrégats.

I-1-1) Taille des particules

Avec la technique de top-down et les mesures DDL, qui sont répétées au minimum 3 fois, les nanoparticules ainsi formées présentent un diamètre moyen entre 99 et 204 nm et sont monodispersées avec un indice de polydispersité inférieur à 0,4. Cette méthode permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules ainsi que la distribution en taille par volume et par intensité correspondante sous la forme de courbes (**Figure 38**).

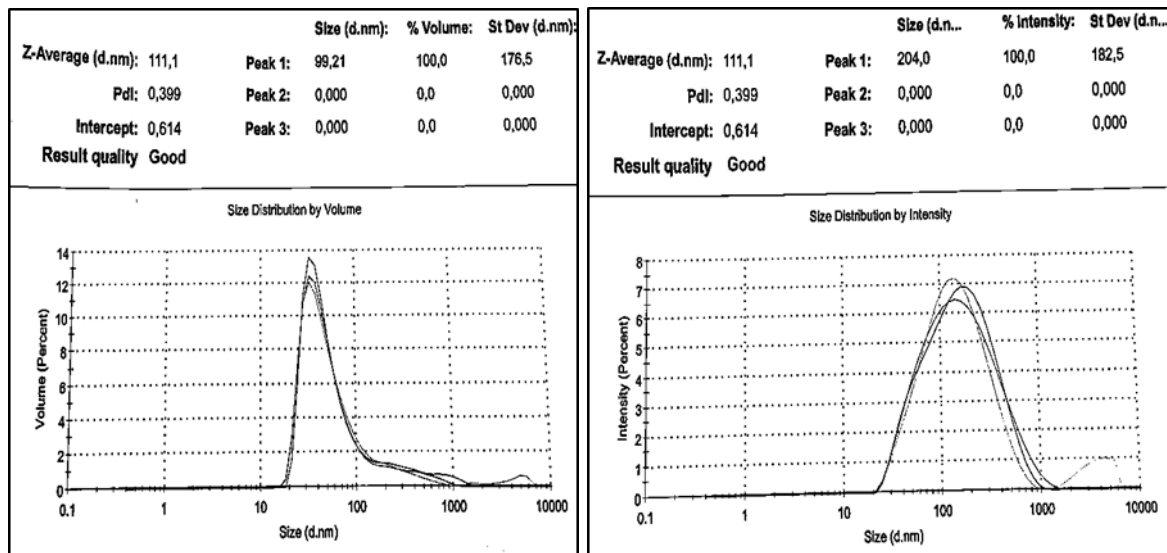


Figure 38: Distribution de taille par volume et par intensité des NPs alginate dans l'eau (111.1 nm de diamètre moyen).

I-1-2) Potentiel zêta

Les particules formées sont chargées négativement à pH neutre, avec une densité de charge importante puisque la valeur du potentiel zêta moyenne est de l'ordre de -32 mV (**Figure 39**). En effet, à pH 7,2 les chaînes de polymères de l'alginate de sodium portent à leur extrémité une fonction carboxylique, qui se retrouve donc à la surface des particules lorsqu'elles sont synthétisées. Dans tous les cas, le potentiel zêta est une donnée importante à déterminer pour les applications envisagées. D'après la littérature, l'alginate est un polyélectrolyte du fait des charges négatives apportées par les fonctions carboxylate des monomères.

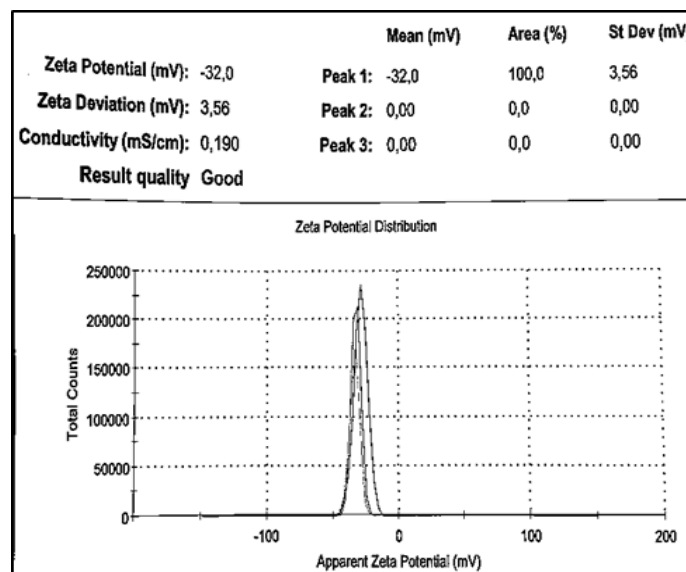


Figure 39: Distribution selon le potentiel zêta de la solution des NPs alginate.

Toutefois l'analyse par diffusion dynamique de lumière ne suffit pas pour la caractérisation des nanoparticules synthétisées. Il est nécessaire d'utiliser des techniques plus fiables comme la microscopie électronique à balayage (MEB).

I-2) Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Pour avoir une idée plus précise sur la taille et la forme des nanoparticules d'alginate, une autre méthode repose sur l'utilisation des techniques de microscopie électronique comme la microscopie électronique à balayage (MEB). Dans ce cas, les particules sont observées à l'état solide, la technique ne tient donc pas compte de l'éventuelle couche d'hydratation des particules, présente en solution. C'est pourquoi il est fréquent d'observer des différences de plusieurs dizaines de nanomètres entre les tailles mesurées en DDL et en microscopie électronique. La différence de diamètre entre les résultats obtenus par diffusion de la lumière

et par microscopie est due, d'une part, à l'ultravide nécessaire à la microscopie électronique à balayage qui « dessèche » les complexes, d'autre part, à la définition du diamètre dans chaque technique. En effet par diffusion de lumière, le diamètre mesuré est le diamètre hydrodynamique qui comprend à la fois la taille des complexes mais aussi l'épaisseur de la couche de solvation alors que la microscopie électronique à balayage permet de mesurer le diamètre des complexes « secs ». La **figure 40** montre la micrographie électronique des nanoparticules. Les formes des nanoparticules synthétisées sont différentes, on peut voir des particules de formes sphérique, rectangulaire et sous forme de bâtonnets.

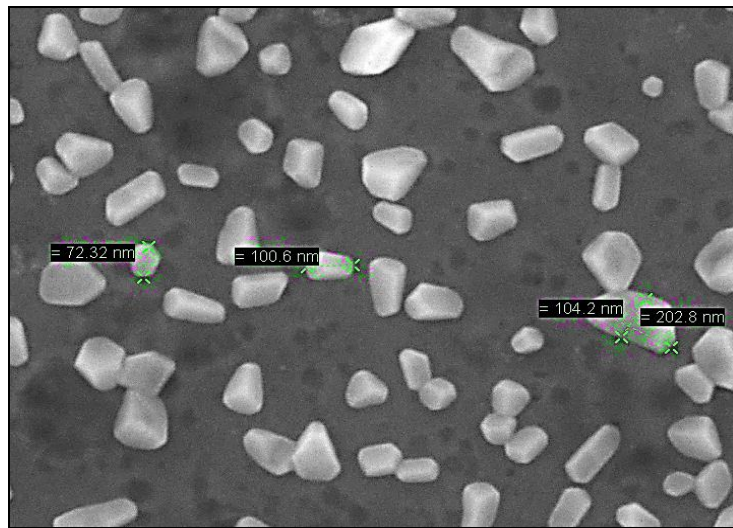


Figure 40 : Micrographie MEB des NPs alginate.

Nous avons donc confirmé par microscopie électronique à balayage (MEB) que les particules synthétisées ont des tailles à échelle nanométrique et qu'elles ont des formes différentes.

La **figure 41** présente la taille moyenne de 100 nanoparticules de chaque forme.

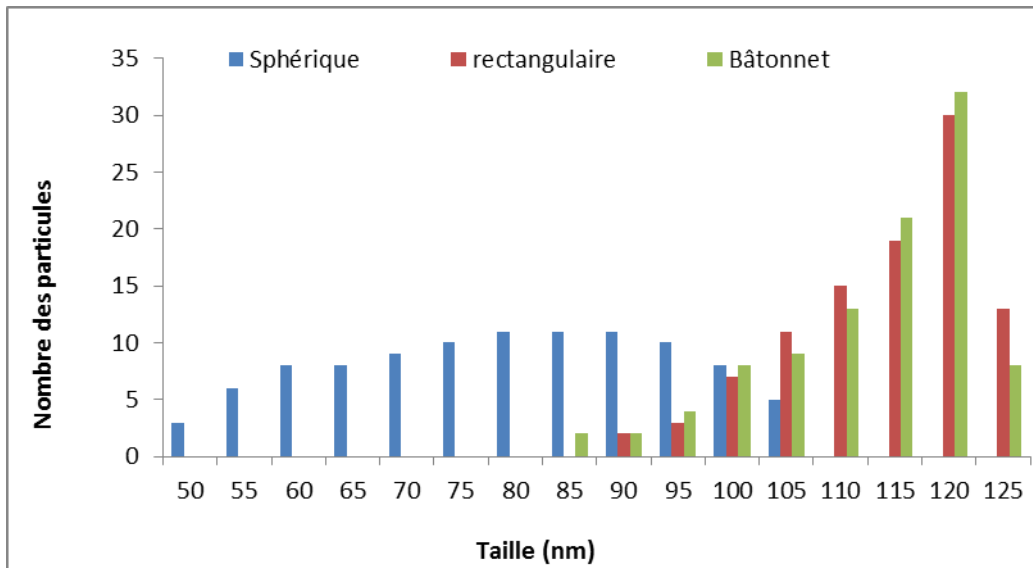


Figure 41 : Nombre et taille des NPs alginate de trois formes différentes

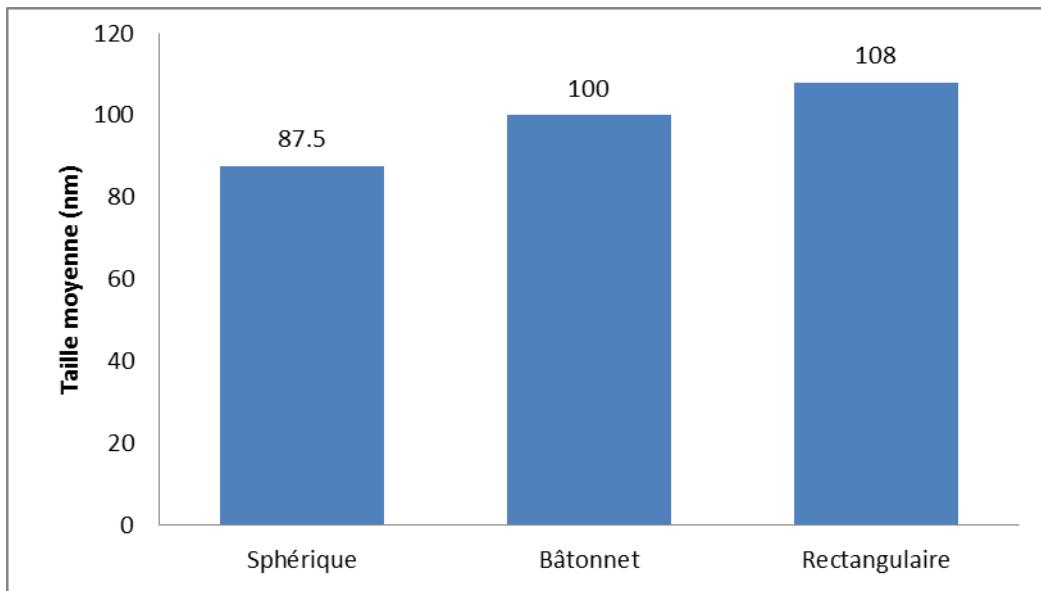


Figure 42 : Taille moyenne des NPs alginate des différentes formes.

La **figure 42** présente la taille moyenne des différentes formes des nanoparticules. D'après ces deux tableaux, la taille moyenne des nanoparticules sphériques est de 87,5 nm, la taille moyenne des nanoparticules rectangulaire est de 100 nm et la taille moyenne des nanoparticules de forme bâtonnets est de 108 nm. Donc les nanoparticules synthétisées sont d'échelle nanométrique

I-3) Analyse thermogravimétrique (ATG)

Le comportement thermique des nanoparticules d'alginate a été analysé par thermogravimétrie entre la température ambiante et 980°C. D'après les données du **tableau 14**, on peut considérer que la première étape de dégradation thermique entre la température ambiante et 200°C, correspond à l'élimination de l'eau dans la structure des nanoparticules, les pertes de masse correspondant à cette étape offrent des informations sur le taux de molécules d'eau adsorbées (**Figure 43**). Après une première étape de déshydratation, la décomposition s'effectue en trois étapes : une perte de poids se produit entre 200 et 300°C et peut être attribuée à la décomposition des chaînes polymères des nanoparticules, la dernière ayant lieu à température supérieure à 600°C. Des études antérieures ont révélé une réaction d'oxydation des hydrates de carbone à une température supérieure à 600°C ([392](#)). Dans ce cas, la stabilité thermique du polysaccharide est plus élevée, ce qui pourrait être attribué à sa structure complexe constituée de blocs avec des formations hélicoïdales qui peuvent contribuer à la stabilité thermique du biopolymère ([393](#), [394](#)). Cette dernière étape, à haute température, est également liée à la présence de sodium dans le composé ([395](#)). Ensuite, une perte de poids constante et continue est observée avec une masse résiduelle de 11,74% à 960 °C.

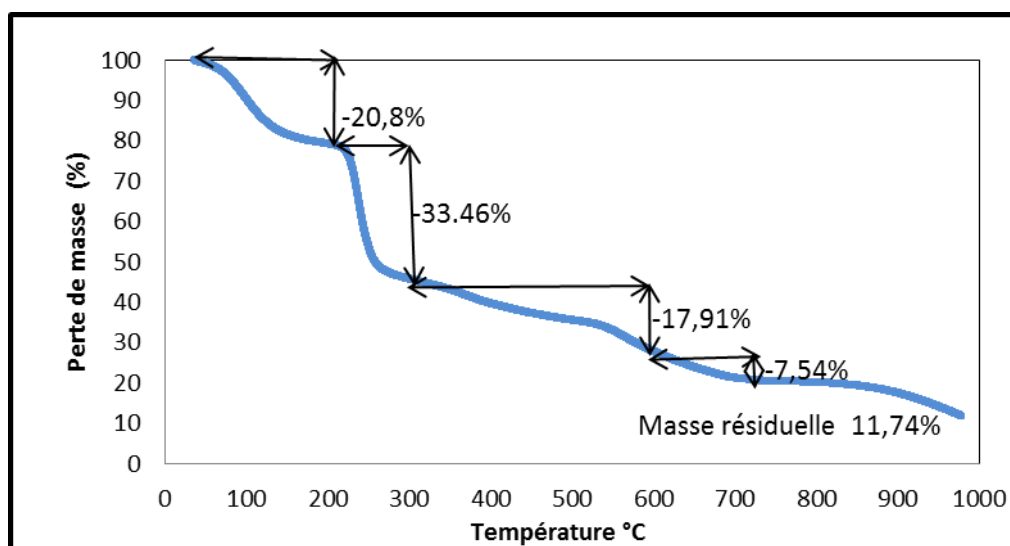


Figure 43 : Courbe thermogravimétrique des NPs alginate.

Tableau 14 : Pertes de masse des NPs alginate de sodium par thermogravimétrie.

Composé	Perte 25-200°C	Perte 200-300°C	Perte 300-600°C	Perte 600-725°C
NPs Alginate	20,8%	33,46%	17,91%	7,54%

I-4) Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une méthode basée sur l'adsorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet de caractériser les groupements fonctionnels de l'alginate, en identifiant leurs bandes d'absorption caractéristiques et d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques. Elle peut aussi vérifier le déplacement de leurs valeurs une fois mélangés. Cette variation peut être due à des modifications chimiques ou physiques induites par les interactions entre les polymères. La **figure 44** montre le spectre enregistré, à température ambiante des nanoparticules d'alginate. Selon le spectre IR des nanoparticules d'alginate, les bandes caractéristiques d'absorption à 1625 et 1410 cm^{-1} représentent respectivement les vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des anions carboxylate (396, 397). La large bande à 3426 cm^{-1} est attribuée à l'élongation des groupements hydroxyles présents dans le squelette de l'alginate de sodium et à la liaison hydrogène (O ... H ... O), tandis que la bande à 2916 cm^{-1} est due à l'élongation -CH₂ (398). La bande à 1032 cm^{-1} est attribuée à l'élongation asymétrique de la liaison C-O-C (399)(399)(399)(399)(398)(397). En outre, le spectre IR de l'alginate de sodium brut montre les mêmes bandes de spectre IR des nanoparticules d'alginate. Ce qui signifie que le broyage de l'alginate de sodium n'affecte pas les différents groupements et les liaisons du squelette de l'alginate.

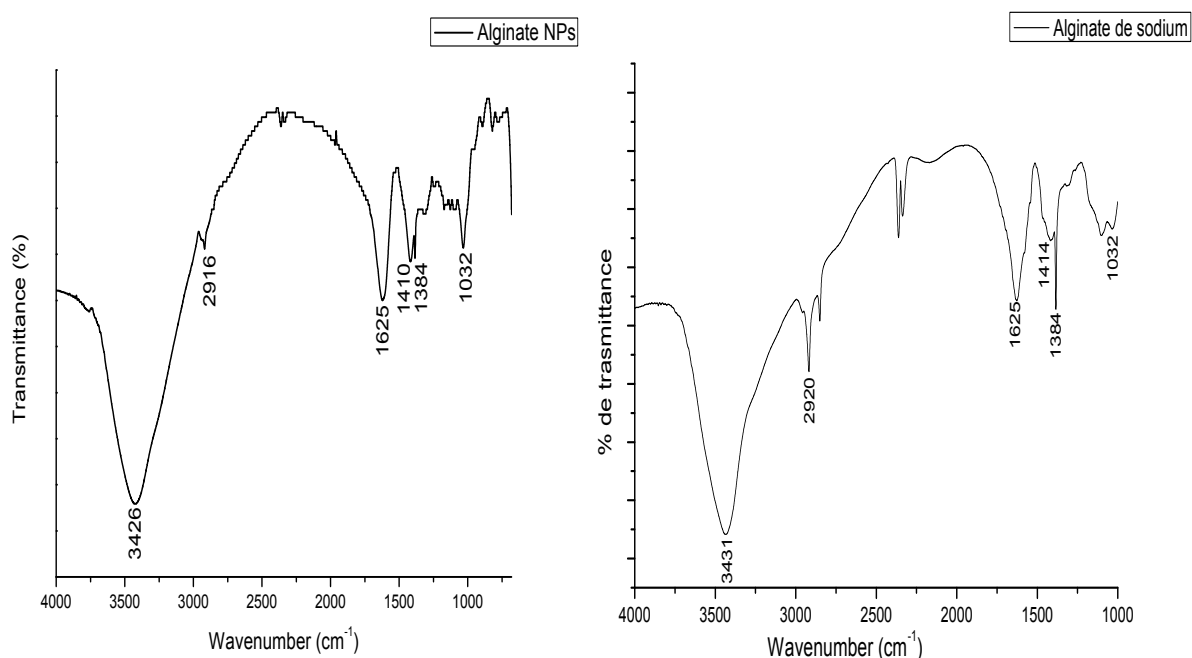


Figure 44 : Spectres FTIR des NPs alginate et l'alginate de sodium brut.

I-5) Diffraction des Rayons X (DRX)

La Diffraction des rayons X (DRX) est une technique puissante, sans effets destructeurs, destinée à caractériser les matériaux cristallins (400). Cette méthode ne s'applique qu'à des milieux cristallins (roches, cristaux, minéraux, pigments, argiles...) présentant les caractéristiques de l'état cristallin, c'est-à-dire un arrangement des atomes constitutifs de façon périodique, ordonné et dans des plans réticulaires tridimensionnels (400). Les domaines d'application de la DRX sont très variés, et peuvent concerner la recherche (réaction chimique ou physique, étude des structures protéiques...) et l'industrie (contrôle qualité d'un produit) (400). Les DRX des deux échantillons (alginate de sodium et nanoparticules d'alginate de sodium) ont été analysés à l'aide du système de diffractomètre à rayons X Phillips Holland PW 1710. La longueur d'onde (λ) du rayonnement était de 1,54056. Les données ont été obtenues sous forme de graphique 2θ en fonction de l'intensité (u.a). Les données obtenues ont été utilisées pour calculer la taille des cristallites en utilisant la formule suivante : Taille de cristallite = $k \lambda / b \cos \theta$ Où λ est la longueur d'onde et k est la constante d'équipement avec une valeur de 0,94.

La figure 45 montre le schéma de diffraction de l'alginate de sodium pur et des nanoparticules d'alginate. La DRX de l'alginate de sodium et des NPs alginate de sodium ont montrées une nature semi-cristalline caractéristique avec deux pics principaux à 2θ de $13,6^\circ$

et 22.8° (401). L'alginate de sodium a montré un élargissement plus important des pics de DRX. On voit que les deux modelés de diffraction présentent des similitudes, et ont une structure amorphe (402, 403).

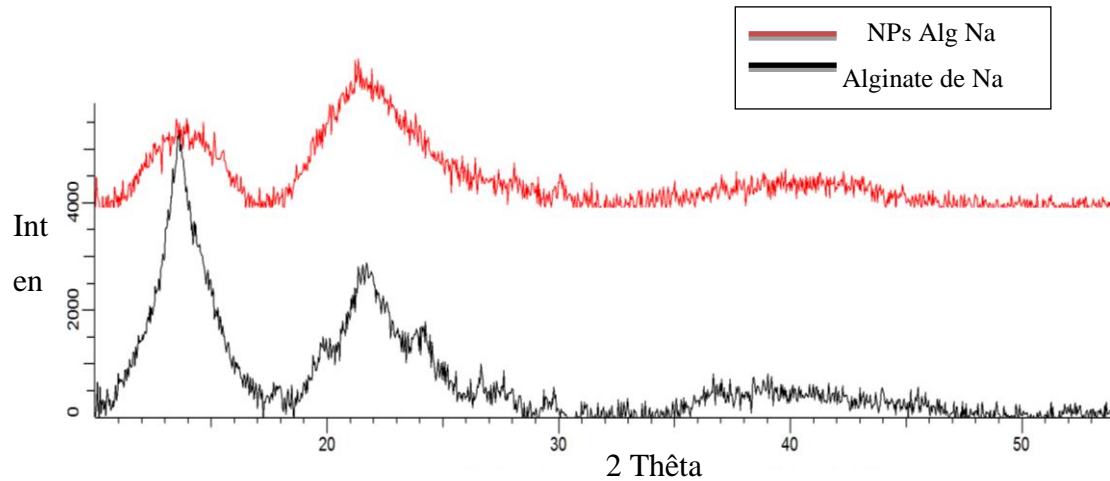


Figure 45 : DRX des NPs alginate et l'alginate de sodium brut.

I-6) Spectrometrie Photoélectronique X (XPS)

La spectroscopie XPS est basée sur la mesure de nombre d'électrons émis par un solide sous l'impact d'un faisceau de photons X (XPS) ou UV (UPS) d'énergie (404). Elle a été réalisée pour obtenir des informations plus détaillées sur la structure chimique des nanoparticules d'alginate et de l'alginate de sodium brut. Le spectre C1s XPS des NPs alginate et de l'alginate de sodium brut présentent de similitudes. Le spectre C1s XPS des NPs alginate (**figure 46**) présente 3 pics à des énergies de liaison de 284,6, 286,5 et 288,5 eV, qui peuvent être attribués à l'atome de carbone sous la forme C-C, C-O et C=O respectivement (405, 406).

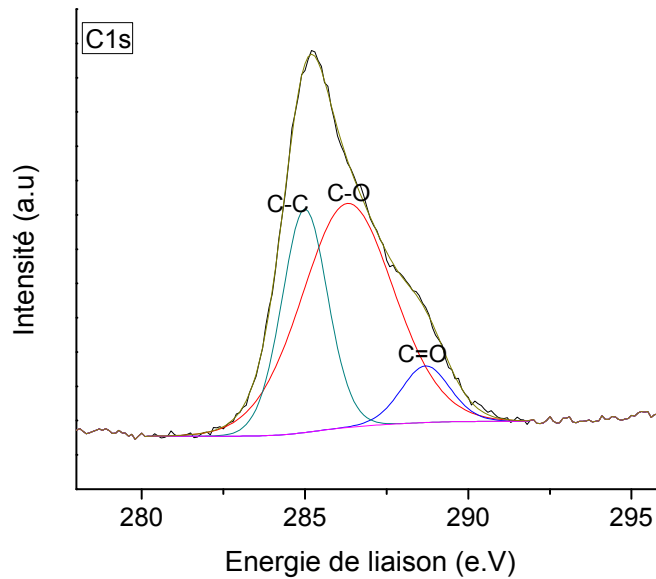


Figure 46 : Spectres XPS (C1s) à balayage étroit des NPs alginate: C-C (bleu); C-O (rouge); C=O (bleu foncée)

I-7) Etude de la stabilité des NPs alginate

La stabilité à long terme des nanoparticules d'alginate est une donnée importante pour les applications biologiques (393). La stabilité physico-chimique des nanoparticules a été étudiée par la mesure de la taille en fonction de temps de stockage à pH 7.

I-7-1) Stabilité au cours du stockage à pH 7

Un lot de nanoparticules d'alginate a été stocké à 4°C. La stabilité de ces nanoparticules a été ensuite étudiée grâce au suivi du diamètre et de l'indice de polydispersité par diffusion dynamique de la lumière (DDL). L'évolution de diamètre moyen et de l'indice de polydispersité des nanoparticules au cours du temps est représentée dans la **figure 47**.

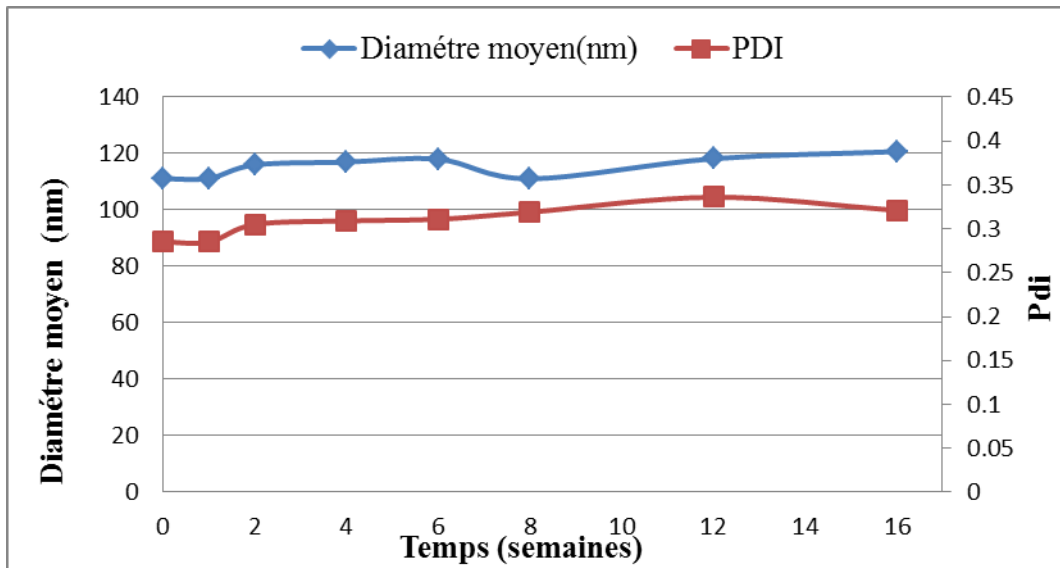


Figure 47 : Evolution de la taille et de l'indice de dispersion des NPs alginate au cours du temps.

Les résultats montrent que les nanoparticules d'alginate sont stables à pH 7 après 16 semaines de stockage à 4°C. La courbe bleue représente la variation de diamètre moyen des nanoparticules et la courbe rouge la mesure de l'indice de polydispersité des nanoparticules d'alginate pendant le stockage. Le diamètre moyen des nanoparticules d'alginate est de $120,7 \pm 7$ nm après 16 semaines, et n'est donc pas modifié au cours de la conservation. D'après la littérature, la stabilité colloïdale de dispersions de nanoparticules est définie comme un état où les particules ne s'agrègent pas rapidement (407). Ce facteur est un indice important pour les applications biologiques des nanoparticules. D'après la littérature, la stabilité de l'alginate dépend fortement de la température, du pH et de la présence de contaminants. Les liaisons glycosuriques sont susceptibles de rompre lorsque l'alginate est utilisé en milieu acide ou basique. Pour des pH supérieur à 10, l'alginate précipite (408), et pour des pH compris entre 3,5 et 10, les fortes répulsions électrostatiques entre groupements carboxylate tendent à écarter les chaînes les unes des autres, produisant des solutions visqueuses et stables. A un pH légèrement inférieur à 3,5, la neutralisation des charges conduit à un rapprochement des chaînes qui s'insolubilisent et précipitent. En dessous de pH 3, un risque d'hydrolyse des chaînes est très probable ; l'effet étant plus prononcé à hautes températures (409). Donc, les résultats obtenus montrent que les nanoparticules d'alginate sont stables à pH 7.

I-8) Etude de marquage et d'internalisation des NPs alginate

I-8-1) Marquage fluorescent des NPs alginate et caractérisations

Afin de les visualiser *in vitro* par fluorescence, les nanoparticules d'alginate ont été élaborées en présence d'un composé fluorescent : la rhodamine B. La rhodamine B est un composé organique colorant (teinture) (410). Comme les autres rhodamines, elle est souvent utilisée comme colorant traceur dans l'eau pour déterminer les volumes, débits et directions d'écoulement et de transport. Les colorants de rhodamines sont fluorescents et sont ainsi facilement visualisés par des instruments appelés fluoromètres. Ces colorants sont utilisés abondamment dans des applications de biotechnologie, telles que la microscopie à fluorescence, la cryométrie en flux, la spectroscopie de corrélation de fluorescence et l'ELISA. La rhodamine B est utilisée en microbiologie comme colorant fluorescent histologique ; c'est un composé organique colorant, détectable par des instruments appelés spectrofluoromètres et qui émet une fluorescence à 550-590 nm (411, 412). La méthodologie de préparation des nanoparticules est décrite dans la partie expérimentale (Cf. partie expérimentale 10.6). Les résultats ont montré que la rhodamine B a été bien incorporée dans les nanoparticules d'alginate et qu'elle n'a pas d'influence sur le diamètre moyen (111,1 nm) de ces dernières. Les nanoparticules gardent une monodispersité importante (PDI~0,4). Par ailleurs, le potentiel zêta des nanoparticules marquées à la rhodamine B a augmenté de -32 mv à -7,08 mV. Comme il a été rapporté dans la littérature, la rhodamine B a un pKa de 3.7(413). A pH >3.7, les attractions entre les groupes carboxyle et xanthène des monomères RhB entraînent la formation de dimères de RhB (414). La rhodamine est un composé cationique, elle porte une charge positive sur sa fonction amine. Les interactions électrostatiques qui se produisent entre les nanoparticules d'alginate chargé négativement et la rhodamine B chargé positivement, expliquent l'augmentation de la valeur de la charge à la surface des nanoparticules d'alginate. La **figure 48** présente les interactions électrostatiques entre la rhodamine B et les nanoparticules d'alginate (415, 416). Donc ce résultat confirme une localisation de la rhodamine B à la surface des nanoparticules d'alginate. Ensuite, nous avons également caractérisé deux lots de nanoparticules avant dialyse et après dialyse par spectroscopie UV-visible. La **figure 49** montre que la rhodamine B incorporée dans les nanoparticules d'alginate émet bien une fluorescence à 590 nm. En effet, la rhodamine B dans la solution non dialysée et la solution dialysée montre le même profil d'absorbance mais avec une diminution de l'intensité d'absorption après dialyse. Cette diminution de l'intensité est due à l'élimination des molécules de rhodamine B adsorbées sur les nanoparticules. Cette

propriété est avantageuse pour la détection des nanoparticules par imagerie en fluorescence afin de mieux appréhender le mécanisme antimicrobien des nanoparticules-peptides.

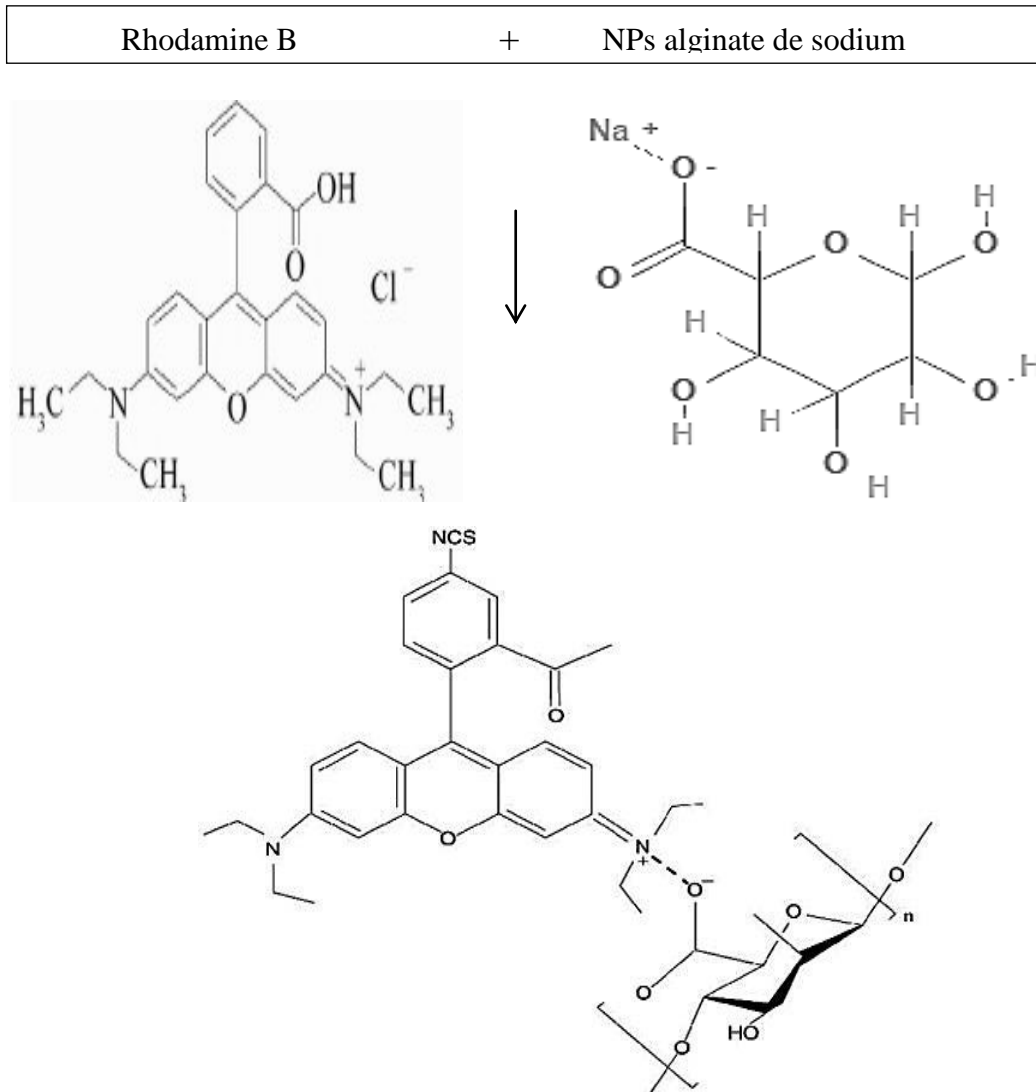


Figure 48: Structure de la rhodamine B adsorbée sur l'alginate de sodium (416).

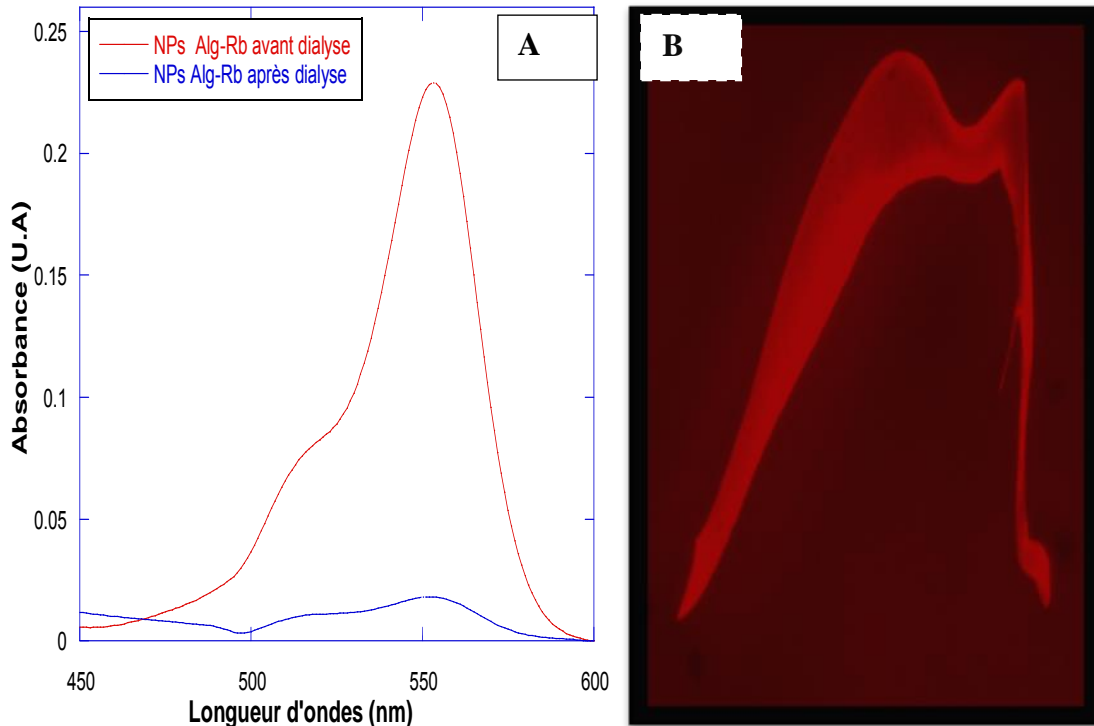


Figure 49 : A) Spectres d'absorption UV-visible des NPs alginate (0.5 mg.mL^{-1}) avant (rouge) et après (bleu) dialyse; B) Microscopie confocale des NPs alginate-RhB.

I-9) Imagerie par fluorescence d'*E. coli* exposées aux NPs alginate+RhB

Pour mieux comprendre le mécanisme d'interaction des nanoparticules d'alginate fluorescentes avec les cellules bactériennes, nous avons incubé des cellules d'*E. coli* 184 avec une solution de nanoparticules d'alginate-rhodamine B après dialyse, à une température de 37°C pendant 18 heures. D'après la littérature, la fluorescence offre une grande gamme d'outils qui permettent de marquer spécifiquement un élément, un organe ou une protéine (417). L'interaction d'*E. coli* 184 avec les nanoparticules d'alginate fluorescentes a été évaluée par microscopie à fluorescence. La **figure 50 A** présente l'image obtenue en fluorescence et la **figure 50 B** représente un agrandissement de l'image en fluorescence d'une cellule bactérienne. On observe quelques points rouges sur l'image de fluorescence de cette bactérie correspondant aux NPs alginate fluorescentes. On peut remarquer que toutes les particules sont associées à la bactérie. À ce stade, il est impossible de confirmer si les particules se trouvent à l'intérieur ou à la surface de la bactérie.

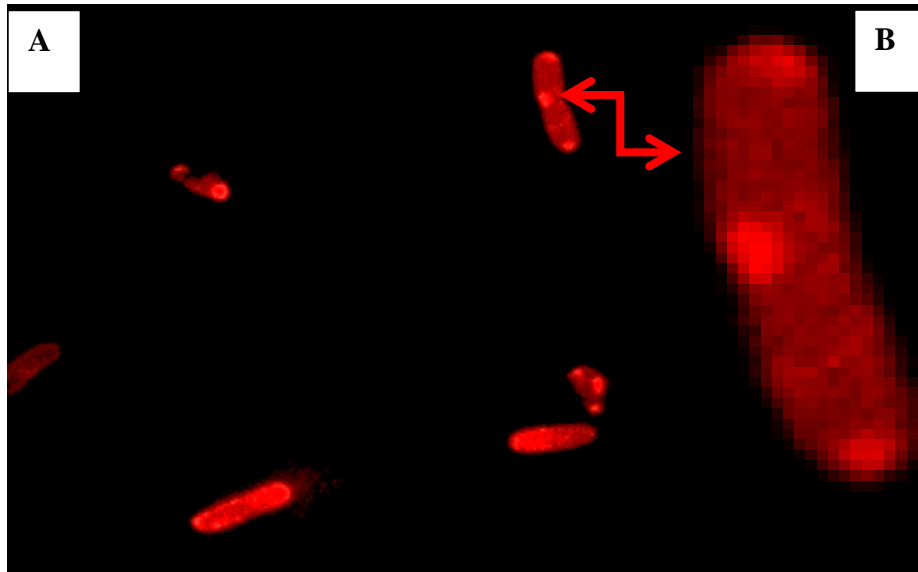


Figure 50 : Observation en microscopie à fluorescence des cellules bactériennes (*E. coli* 184) après 18 heures d'incubation avec des NPs alginate–RhB.

Nous avons fait varier par la suite le temps d'incubation des cellules avec les nanoparticules entre 1 et 4 heures, afin de suivre la cinétique d'interaction des NPs alginate fluorescentes.

La **figure 51** montre qu'après 2 heures d'interaction, de nombreuses cellules sont associées au NPs alginate et qu'après 4 heures d'interaction, plusieurs nanoparticules sont souvent observées sur une bactérie.

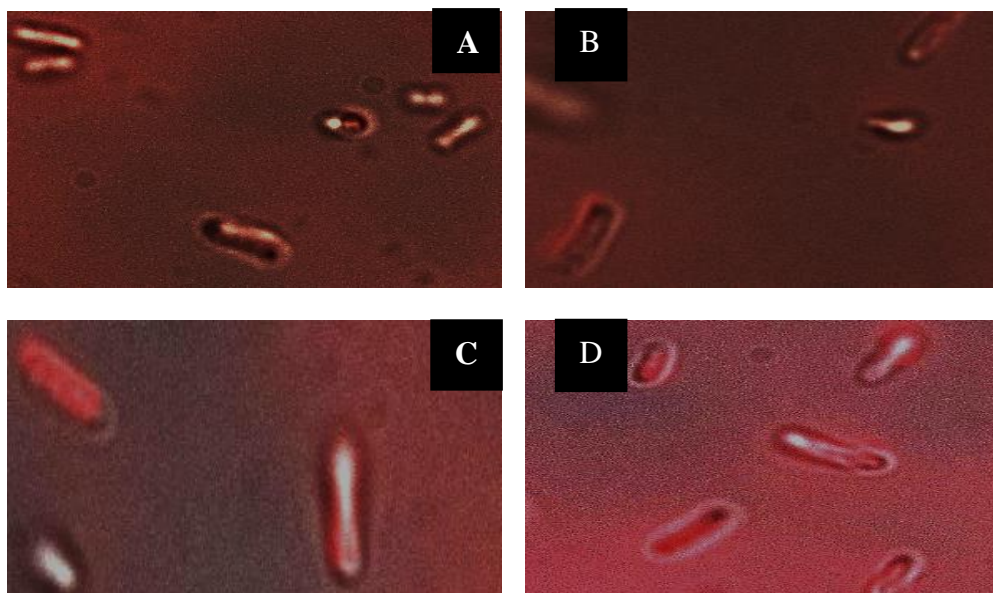


Figure 51 : Microscopie à fluorescence des cellules d'*E. coli* incubées avec des NPs alginate marquées à la rhodamine B ; A : 1 heure d'incubation ; B : 2 heures d'incubation ; C : 3 heures d'incubation ; D : 4 heures d'incubation.

Après observation de l'interaction des NPs alginate avec la bactérie *E. coli* (**Figure 50**), nous avons constaté la probabilité que les nanoparticules d'alginate peuvent être associées à la cellule après l'interaction. En outre, il est difficile de déterminer si les particules sont à l'intérieur des bactéries à partir des images de microscopie, car elles pourraient également se trouver à la surface des bactéries.

II) Développement de formulations antibiotiques à base de colistine + nanoparticules d'alginate et de petites molécules

Ce travail met en relief l'effet des combinaisons de la colistine avec des nanoparticules d'alginate et de petites molécules dans le but de potentialiser l'activité de cet antibiotique contre *E. coli*. Le principal objectif de l'association des nanoparticules d'alginate avec la colistine est de réduire la quantité de colistine utilisée mais aussi de conserver son activité antibactérienne jusqu'au site d'infection. Par voie de conséquence, la réduction de la quantité de colistine utilisée est une chose doublement positive. D'abord, sur le plan du contrôle des effets secondaires de cet antibiotique, qui à des concentrations élevées est néphrotoxique. D'autre part, cette approche va contribuer à réduire les possibilités de développement de résistance bactérienne.

La combinaison de la colistine avec les petites molécules aura sans doute un effet sur les bactéries à Gram-négatif, principalement les souches d'*Escherichia coli* résistantes à la colistine. Parmi les petites molécules qui ont fait l'objet d'études, dans le cadre de ce projet, il y a les polyamines, les huiles essentielles et l'acide lactique.

Les polyamines sont des composés ayant des charges positives dues à la présence de groupements aminés chargés positivement. Les polyamines possèdent des activités antimicrobiennes *in vitro* à la fois sur les bactéries à Gram-positif et Gram-négatif, y compris sur des souches d'origine clinique multirésistantes. En terme de mode d'action, les polyamines agissent sur le LPS en provoquant son réarrangement (418).

Les huiles essentielles utilisées dans ce projet sont le carvacrol, le thymol, le farnésol, le géraniol et le menthol. Ces molécules exercent une activité bactéricide sur les cellules cibles, elles agissent sur les membranes cytoplasmiques, entraînant des altérations et par voie de conséquence la fuite des métabolites intracellulaires (419). L'acide organique utilisé ici est l'acide lactique. Il est produit par les bactéries lactiques et est capable d'inhiber la croissance des agents pathogènes (420). L'acide lactique est largement utilisé pour inhiber la croissance de certains agents pathogènes comme *E. coli*, *L. monocytogenes* et *Sal. Enteritidis* (421, 422). Dans la première partie de cette section, nous allons établir les effets de la combinaison de la colistine avec les nanoparticules d'alginate. Ainsi, les caractéristiques de ces nanoparticules, la quantification des molécules fixées par HPLC et l'activité contre la bactérie cible *E. coli* seront illustrées. Dans la même optique, l'évaluation de la cytotoxicité de cette formulation

Résultats et discussions

sera établie sur deux lignées cellulaires humaines (HT-29) et porcines (IPEC-1). Nous aborderons ensuite, dans la seconde partie, l'amélioration de cette activité par l'utilisation de petites molécules (Polyamine, huile essentielle et acides organique).

II-1) Combinaison de la colistine avec des NPs alginate

II-1-1) Caractérisations des NPs alginate+colistine

➤ **Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)**

L'interaction entre les nanoparticules d'alginate portant des charges négatives, apportées par les fonctions carboxylate de surface et la colistine chargée positivement à pH 7,2, se fait principalement par interactions électrostatiques. Les nanoparticules d'alginate sont utilisées à une concentration fixe de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, car avec une telle concentration, le diamètre moyen est de 111,1 nm. Le choix de cette concentration en nanoparticules a été arrêté pour deux raisons simples : l'utilisation d'une faible quantité en nanoparticules et les contraintes expérimentales imposées (l'agrégation). Le **tableau 15** présente l'ensemble des résultats (taille des particules et potentiel zêta) obtenus par la mesure en DDL à pH 6,5 avec les nanoparticules d'alginate+colistine à différents ratios.

Tableau 15 : Mesures DDL des NPs alginate+colistine à différents ratios.

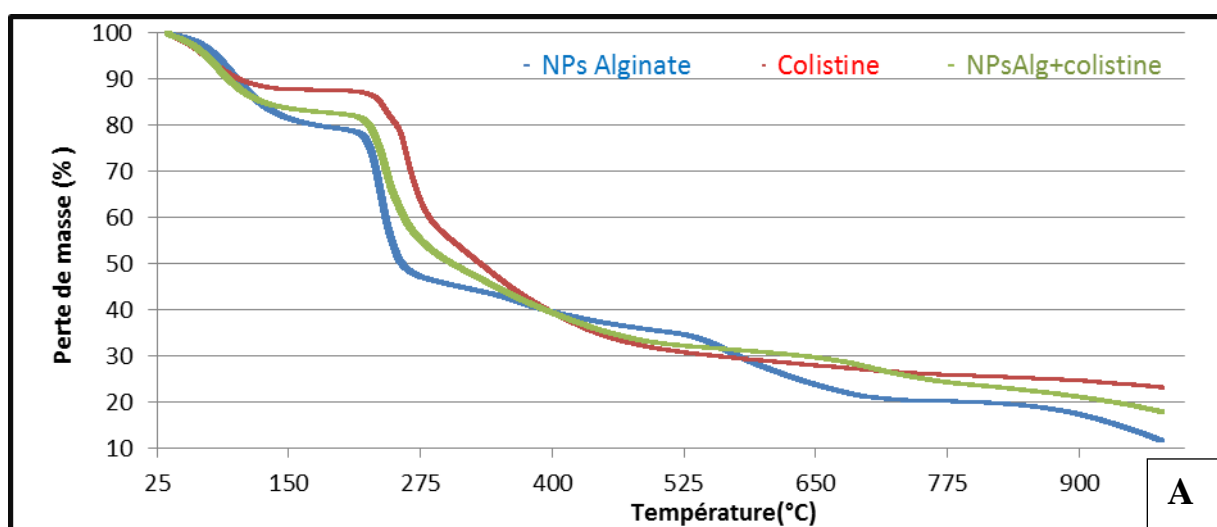
NPs alginate : Colistine (Alg C)	1 : 0	1:1	2 : 1	3 : 1	4 : 1	8.3 : 1
[NPs Alg] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500	500	500	500	500	500
[Colistine] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	500	250	167	125	60
Taille (nm)	111,1	122.7	120	118	116.8	112,4
Potentiel zêta(ζ) (mv)	-32	+4,5	+2,8	+ 2,1	+1,2	+0.7
Indice de polydispersité	0.24	0,20	0,15	0,14	0,19	0,17

La taille moyenne des nanoparticules d'alginate sans colistine est de 111,1 nm (cf. résultats, chapitre 1; 1.1). En ce qui concerne la taille des nanoparticules d'alginate combinées avec la colistine, le diamètre moyen augmente légèrement de 111,1 nm à 122 nm avec une concentration en NPs Alg de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indiquant que la combinaison de la colistine avec les nanoparticules à peu impacté la taille des nanoparticules. La charge des nanoparticules d'alginate sans colistine est de -32 mV. Après adsorption de la colistine à la surface des nanoparticules d'alginate, le potentiel zêta a augmenté de -32 mV à +0,7 mV et +4,5 mV avec le mélange NPs Alg+Colistine (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et le mélange NPs Alg+Colistine (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$:500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) respectivement. Ces données indiquent que l'adsorption de la colistine sur la surface des nanoparticules a diminué la charge négative des groupements

carboxyles des nanoparticules suite à une interaction électrostatique entre les charges positives et négatives. Selon les données de la littérature, la structure de la colistine consiste en un cycle cycloheptapeptidique hydrophile avec trois groupes amines chargés positivement, une queue avec deux groupes amines chargés positivement, et une queue de chaîne acyle hydrophobe (423). Les masses moléculaires pour la colistine A, la colistine B, la polymyxine B1 et la polymyxine B2 sont de 1,17 KDa, 1,155 KDa, 1,204 KDa et 1,19 KDa respectivement (100, 424). Cet antibiotique a une forte charge positive et une chaîne acyle hydrophobe permettant une forte affinité de liaison et d'interaction électrostatique avec les charges négatives (425, 426). Son caractère hydrophobe est attribué au fragment d'acide gras et les propriétés basiques (pKa environ 10) des cinq groupements γ -amine. Dans les conditions physiologiques (pH \approx 7,4) et dans l'urine (pH \approx 6,4), c'est un polycation (427, 428). Par conséquent, la colistine est amphipathique, capable de bien se répartir dans les environnements polaires et non polaires, tels que dans l'eau et dans les membranes lipidiques des procaryotes (427).

➤ Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les résultats de l'analyse thermogravimétrique (TGA) sont présentés dans la **figure 52 A**, tandis que les données thermogravimétriques différentielles (DTG) sont rapportées dans la **figure 52 B**, pour les nanoparticules d'alginate, la colistine et les nanoparticules alginate+colistine.



Les données DTG ont été déduites des données TGA par la dérivée du pourcentage de perte de masse par rapport au temps. Chaque pic dans les courbes DTG représente la

température à laquelle le taux de dégradation est maximal pour chaque étape de dégradation du processus, nous pouvons constater ce qui suit :

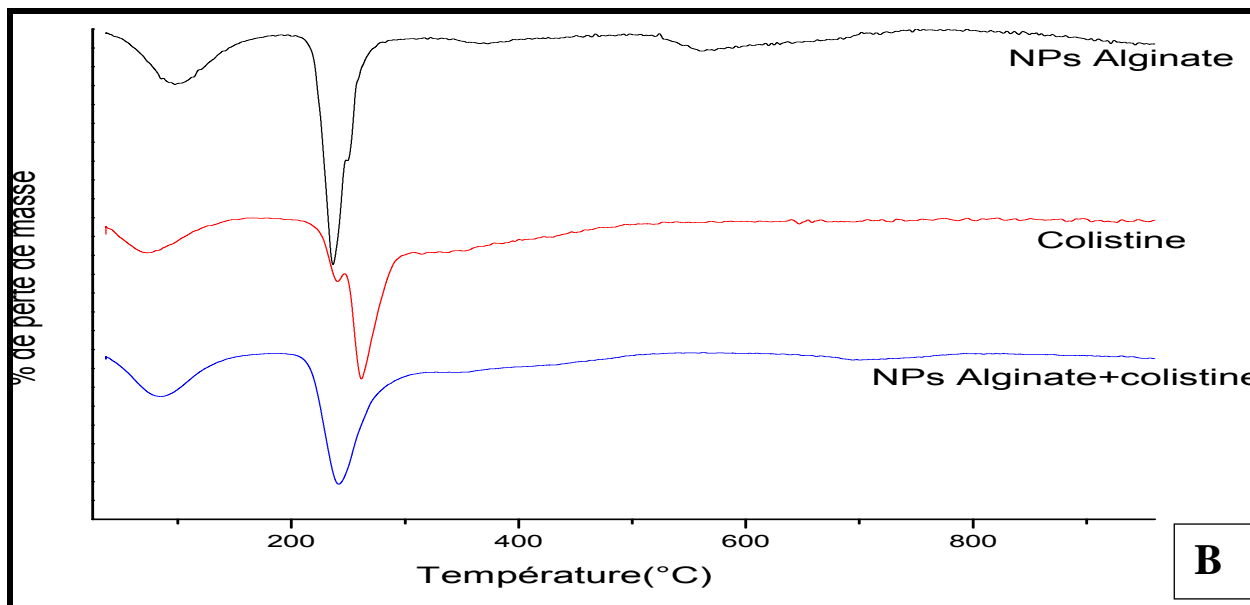


Figure 52 : La dégradation thermique des NPs alginate (NPsAlg), de la colistine et de mélange NPs alginate+colistine ; A: Données d'analyse thermogravimétrique (TGA), elle présente le pourcentage de perte de masse en fonction de la température B : Données de Thermogravimétrie Différentielle (DTG).

On assiste à un processus de perte de poids similaire pour tous les composés. Au regard de l'allure des courbes, la dégradation thermique située entre 50°C et 100°C est relative à l'évaporation de l'humidité et la désorption des gaz. Il convient de remarquer que ce processus est similaire pour les trois composés. A partir de 200°C, nous constatons que l'alginate a deux étapes de pyrolyse : le premier processus de dégradation thermique se produit dans la plage de température allant de 200 à 300 °C (température maximum de dégradation est 235°C). La perte de poids au premier stade est attribuée à la dégradation des groupes carboxyles et à la libération de CO₂. La deuxième étape s'est produite dans la gamme de température 527-700°C (la température maximale de dégradation est 550°C), et est attribuée à la dépolymérisation du polymère et à la formation d'un résidu carboné (429).

Nous pouvons observer que la dégradation thermique de la colistine se produit dans la plage de températures comprises entre 200 et 525°C (la température maximum de dégradation est 261°C). Par la suite, la dégradation thermique des composés alginate+colistine montre deux étapes de pyrolyse au lieu des trois étapes qui résulteraient de la somme des matériaux

individuels, le premier palier de dégradation entre 200-500°C (la température maximum de dégradation est 238°C) et la deuxième entre 625-800°C (la température maximale de dégradation est 701°C). Cependant, en comparant la tendance avec les polymères, le nombre réduit d'étapes de pyrolyse et les emplacements des pics décalés de DTG soutiennent qualitativement la formation de nouvelles liaisons électrostatiques entre la charge négative des groupements COO^- des nanoparticules d'alginate et la charge positive des groupements NH_2 de la colistine. Cependant, cette caractérisation reste qualitative car la dégradation de la colistine se fait en même temps que la dégradation des nanoparticules d'alginate organiques et donc on ne peut pas déterminer la quantité de la colistine adsorbée à la surface des NPs Alg par cette méthode.

➤ Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy) est une technique puissante utilisée dans l'étude de systèmes à plusieurs composants. En effet, elle fournit des informations sur la composition du mélange ainsi que sur les interactions polymère-polymère. Elle a été adoptée pour caractériser les interactions potentielles entre les nanoparticules d'alginate et la colistine. Les spectres FTIR de l'alginate, de la colistine et des nanoparticules chargées de colistine sont représentés dans la **figure 53**. Dans le spectre IR de la colistine, la large bande à 3387 cm^{-1} correspond aux vibrations des groupes hydroxyle. Le pic à 3070 cm^{-1} est dû à l'étirement de la liaison OH, alors que les pics à 2961 cm^{-1} et 1384 cm^{-1} correspondent respectivement à l'élongation symétrique et asymétrique de la chaîne carbonée (CH_3); le pic à 1114 cm^{-1} correspond à l'étirement de la liaison C-N et la bande d'étirement du carbonyle (C=O) de l'amide secondaire (bande d'amide I) est à 1655 cm^{-1} . Les vibrations de flexion de NH (résidus N-acétyle, bande d'amide II) est à 1533 cm^{-1} et la vibration à 1384 cm^{-1} est due à l'étirement du groupement hydroxyle (O-H)(430). Le spectre IR des nanoparticules d'alginate comprend les bandes caractéristiques de vibration à 1625 cm^{-1} et 1410 cm^{-1} dues respectivement aux vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des carboxylates (396, 397). La large bande à 3426 cm^{-1} est attribuée à l'élongation des groupements hydroxyles présents dans le squelette de l'alginate de sodium et à la liaison hydrogène ($\text{O} \dots \text{H} + \dots \text{O}$), tandis que la bande à 2916 cm^{-1} est affecté à l'élongation $-\text{CH}_2$ (398). La bande à 1032 cm^{-1} est attribuée à l'élongation asymétrique de la liaison C-O-C (399, 429, 431-433).

Dans le spectre FTIR des nanoparticules d'alginate+colistine, un nouveau pic à 1093 cm^{-1} apparaît, il correspond à l'étirement de la liaison C-N de l'amine. On peut voir, que dans le spectre des nanoparticules d'alginate modifiées par la colistine, le pic carbonyle (1625 cm^{-1}) est déplacé à 1614 cm^{-1} , suggérant la formation d'une liaison amide entre l'alginate et la colistine (433, 434). De plus, l'intensité de la bande de vibration à 1114 cm^{-1} liée à l'amine aliphatique a été réduite. En outre, l'intensité du pic à 1410 cm^{-1} est diminuée. Les bandes à 1384 cm^{-1} disparaissent et une nouvelle bande à 1309 cm^{-1} apparaît. Alors que les bandes observées à 3410 et 2941 cm^{-1} correspondent à l'étirement de groupement hydroxyle (OH) de la liaison hydrogène intermoléculaire. Ce résultat indique de nouvelles liaisons formées entre les groupes- NH_2^+ de la colistine et les groupements carboxyle COO^- de l'alginate.

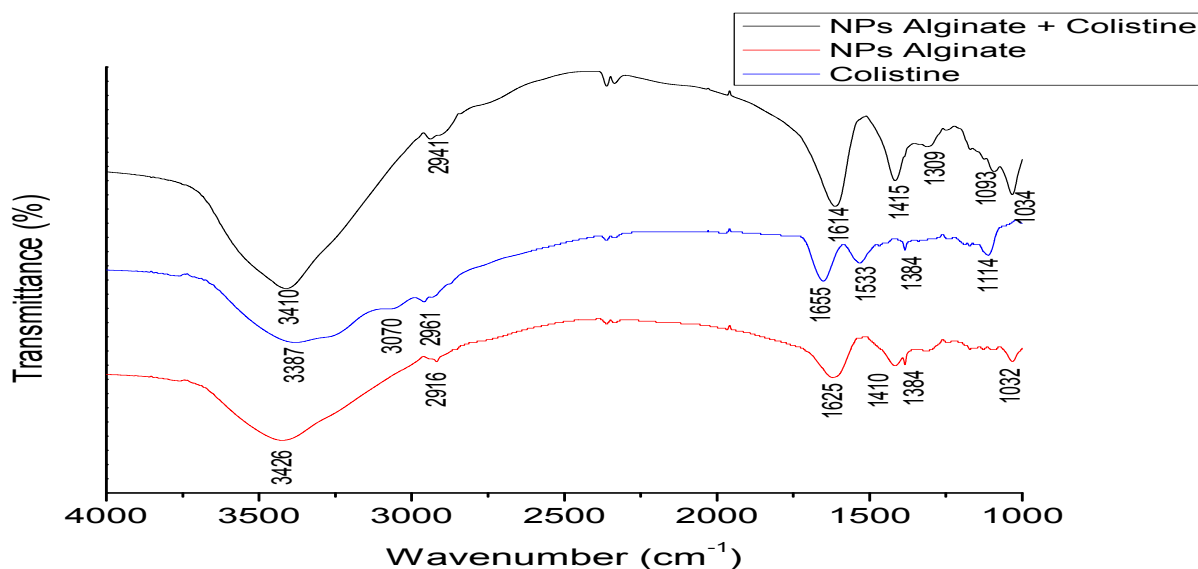


Figure 53 : Spectres FTIR des NPs alginate, de la colistine et des NPs alginate +colistine.

II-1-2) Détermination de la quantité maximale de la colistine adsorbée à la surface des NPs alginate.

Pour déterminer la quantité maximale de colistine adsorbée à la surface des nanoparticules, la méthode de chromatographie liquide à haute performance a été utilisée. La méthodologie des analyses est décrite dans la partie expérimentale (cf. partie expérimentale III.7, tableau 7, Annexe 3). Dans toutes les solutions, la concentration des nanoparticules d'alginate est de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, alors que la concentration en colistine est variable selon les solutions [(20, 40, 50, 60, 80 et 100) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (cf. partie expérimentale III.7 et annexe 3). La mesure en HPLC a été effectuée pour des solutions avec et sans nanoparticules d'alginate. Les résultats obtenus par l'analyse chromatographique sont présentés dans la figure 54 et le

tableau 16. La variation de la concentration en colistine entre les solutions avant et après dialyse est due à l'exclusion de la colistine par la membrane. Comme rapporté dans la littérature, la dialyse conduit à la séparation des petites molécules des grosses molécules (435). La membrane de dialyse utilisée possède un seuil de coupure de 14 kDa, elle ne permet donc pas le passage des nanoparticules d'alginate, car celles-ci présentent des tailles allant de 99 à 200 nm, mais permet la diffusion de la colistine libre. Lorsque cette dernière est fixée sur les nanoparticules, elle ne traverse pas la membrane car la porosité est plus petite que la taille des nanoparticules associées avec la colistine.

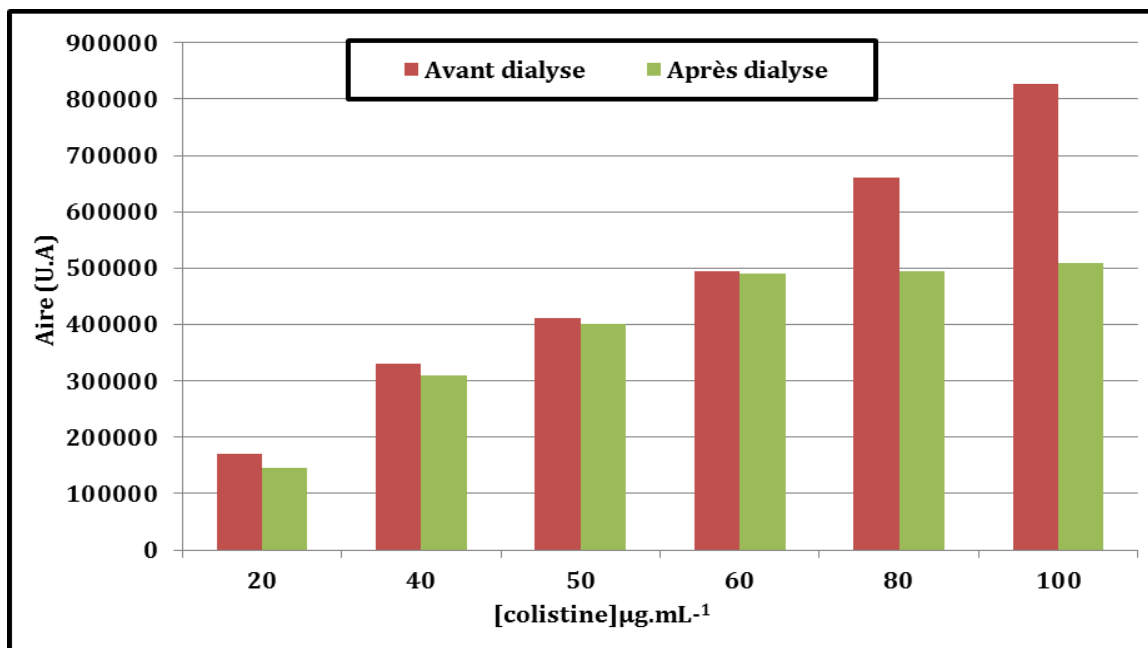


Figure 54 : Variation de l'aire du pic des différentes concentrations de la colistine avant dialyse (rouge) et après dialyse (vert).

Tableau 16 : Concentration de colistine adsorbée sur les NPs alginate après dialyse.

[Colistine] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) avant dialyse	Aire des pics avant dialyse	Aire pic après dialyse(Y)	[Colistine] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) après dialyse (X)*	**Pourcentage de la colistine adsorbé sur les NPs d'alginate
60	494919	401327	48,65	9,73%
80	659882	494920	60,00	12%
100	827850	510102	61,84	12,4%
*Y=8248,5X; X=Y/8248,5				
**Pourcentage : c'est le pourcentage de la colistine par rapport à la concentration des nanoparticules d'alginate				

*X : concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de la colistine après dialyse ; Y : l'aire du pic après dialyse ; $\alpha=8248,5$

Pour les concentrations de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, l'aire des pics avant et après dialyse augmente de façon concomitante, cependant avec une différence moyenne de 5,9%. Ceci signifie que presque toute la colistine se situe à la surface des NPs Alg. Cependant, au-dessus de 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, et pour une concentration 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, la concentration de la colistine dans les solutions après dialyse est de 60 à 62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Celle-ci reste presque stable au-delà de ces concentrations avec une faible différence de 0,4%. Donc d'après les résultats présentés dans la figure 53 et les calculs effectués suivant la formule obtenue dans la courbe de calibration ($Y=8248,5X$), on peut conclure que la quantité maximale de la colistine adsorbée à la surface des nanoparticules d'alginate est de 12% à 12,8% (60 à 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Ce pourcentage est par rapport à la concentration des nanoparticules d'alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

II-1-3) Détermination des diamètres d'inhibition (DI)

Nous avons testé 3 solutions de nanoparticules d'alginate + colistine avec différents ratios. L'évaluation de l'activité antibactérienne de ces 3 solutions a été effectuée suivant la technique de diffusion en milieu gélosé qui peut entraver la diffusion des molécules potentiellement actives. Les tests ont été effectués avec 3 souches d'*E. coli*, deux souches résistantes à la colistine [ER184 (*mcr-1*⁺), ER289 (*mcr-1*⁻)] et une souche sensible à la colistine CIP 7628. La **figure 55** présente les résultats du test de diffusion en milieu solide.

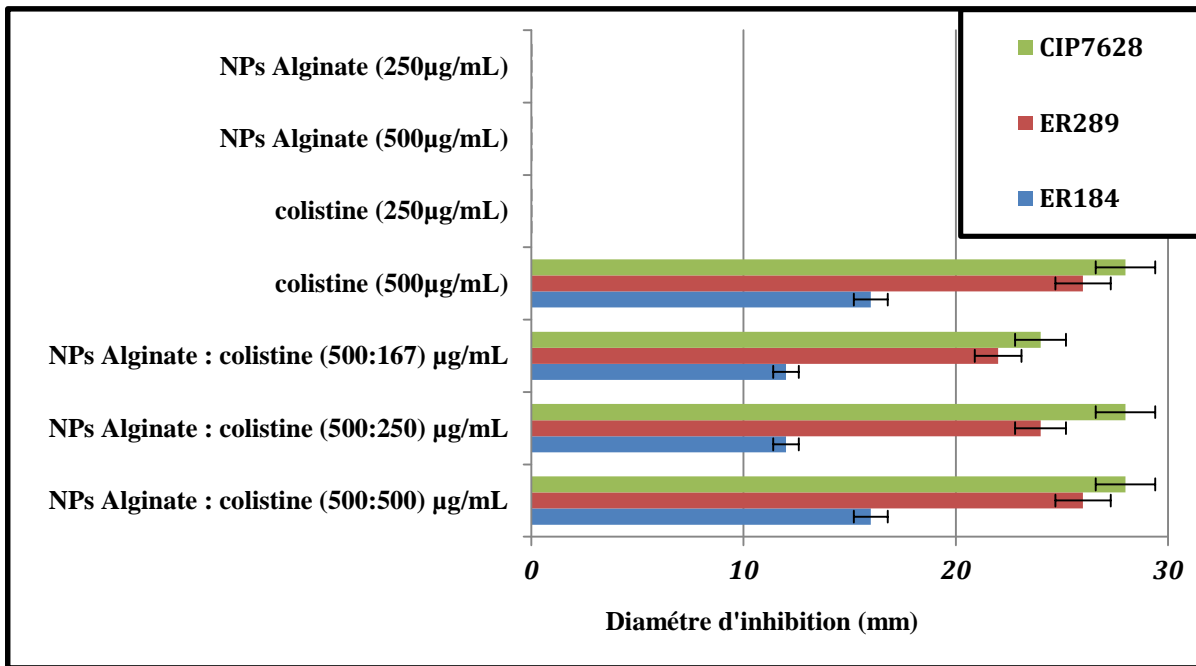


Figure 55 : Activité anti-*E. coli* de 3 solutions des NPs alginate + colistine évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les nanoparticules d’alginate de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ne semblent pas avoir une activité antibiotique contre *E. coli* (absence d’halo d’inhibition). De la même manière, la colistine à une concentration de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, possède un effet inhibiteur sur la croissance d’*E.coli*. Elle provoque un retard de croissance représenté par un halo très faiblement visible (**figure 56**).

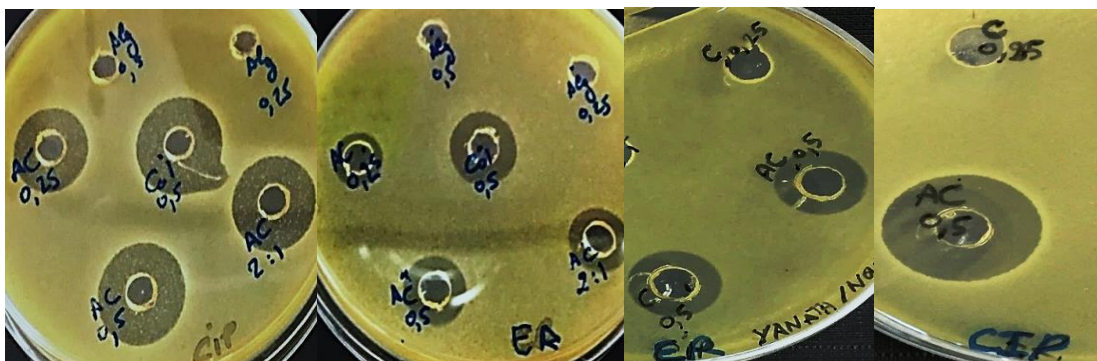


Figure 56 : Activité antibactérienne sur boîte de gélose des solutions des NPs alginate + colistine avec *E. coli* 184 et *E. coli* CIP 7628.

Pour la colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), les diamètres d'inhibition sont de 16 mm pour *E. coli* 184, 26 mm pour *E. coli* 289 et 28 mm pour *E. coli* CIP 7628. Ces résultats indiquent une certaine sensibilité de ces trois souches, à l'endroit de la colistine, mais avec un effet souche-dépendant. La souche *E. coli* 184 étant la moins sensible à la colistine que les souches *E. coli* 289 et *E. coli* CIP 7628. Il convient de noter que l'activité antibiotique (anti-*E. coli*) obtenue avec la formulation NPs alginate+colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1} : 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est différente de celle obtenue avec la colistine seule ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), malgré l'utilisation de la même concentration de colistine. La colistine seule à $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ provoque un retard de croissance, alors que la formulation NPs alginate +colistine ($500 : 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) semble inhiber plus fortement la croissance d'*E.coli*, au regard des halos d'inhibition ayant des diamètres allant de 12 mm pour *E. coli* 184 à 28 mm pour *E. coli* CIP 7628. Ces résultats démontrent que les nanoparticules d'alginate ont permis d'améliorer son action antibiotique.

A noter également que le diamètre d'inhibition de 12 mm enregistré contre *E. coli* 184 et attribué à la formulation NPs alginate+colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1} : 167 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est égal au diamètre d'inhibition généré par la formulation NPs alginate+colistine ($500 \mu\text{g.ml}^{-1} : 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Par ailleurs, le diamètre d'inhibition de 28 mm observé contre *E. coli* CIP 7628 après traitement avec la formulation NPs alginate + colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1} : 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est égal au diamètre d'inhibition obtenu avec la formulation NPs alginate+colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1} : 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Sur la base de ces résultats, nous pouvons déduire que les nanoparticules d'alginate potentialisent l'activité anti-*E. coli* de la colistine.

II-1-4) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Le **tableau 17** présente les résultats des CMI obtenus avec deux solutions de nanoparticules d'alginate + colistine.

Tableau 17 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des différentes solutions de la colistine sur 3 souches d'*Escherichia coli*.

	<i>E. coli</i> 184	<i>E. coli</i> 289	<i>E. coli</i> ATCC8739
Solutions	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
Colistine [$60 \mu\text{g.mL}^{-1}$]	8	8	2
NPs alginate + colistine [$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$]	4	4	1

Avec une concentration de la colistine de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$, la CMI obtenue contre *E. coli* 184 et *E. coli* 289 est de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, deux fois plus importante que celle obtenue avec la solution NPs alginate + colistine ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) en utilisant les mêmes souches cibles. D'autre part, la CMI obtenue avec la solution colistine (sans NPs alginate) contre *E. coli* ATCC8739 est de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, deux fois plus élevée que la CMI de la colistine avec la solution NPs alginate+colistine qui est de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainsi, la combinaison de la colistine avec des nanoparticules d'alginate (solution NPs alginate +colistine) entraîne la diminution de la CMI de la colistine (solution colistine) d'un facteur de 2, passant de 8 à $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec *E. coli* 184, *E. coli* 289 et *E. coli* ATCC8739. Comme il a été rapporté dans la littérature, la colistine est une molécule bactéricide, à spectre étroit, dirigée majoritairement contre les BGN. Sa cible d'action est le lipopolysaccharide (LPS), composant important de la membrane externe des BGN. Grâce à la forte charge positive et la chaîne acyle hydrophobe de la colistine, ces deux composants lui permettent une forte affinité de liaison pour les molécules de lipopolysaccharide (423). Cette molécule se fixe sur le LPS (à la place des ions Ca^{2+} et Mg^{2+}) provoquant une désorganisation de la paroi suivie d'une augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique. Ces modifications majeures aboutissent à la lyse rapide de la membrane et la mort de la bactérie (figure 57).

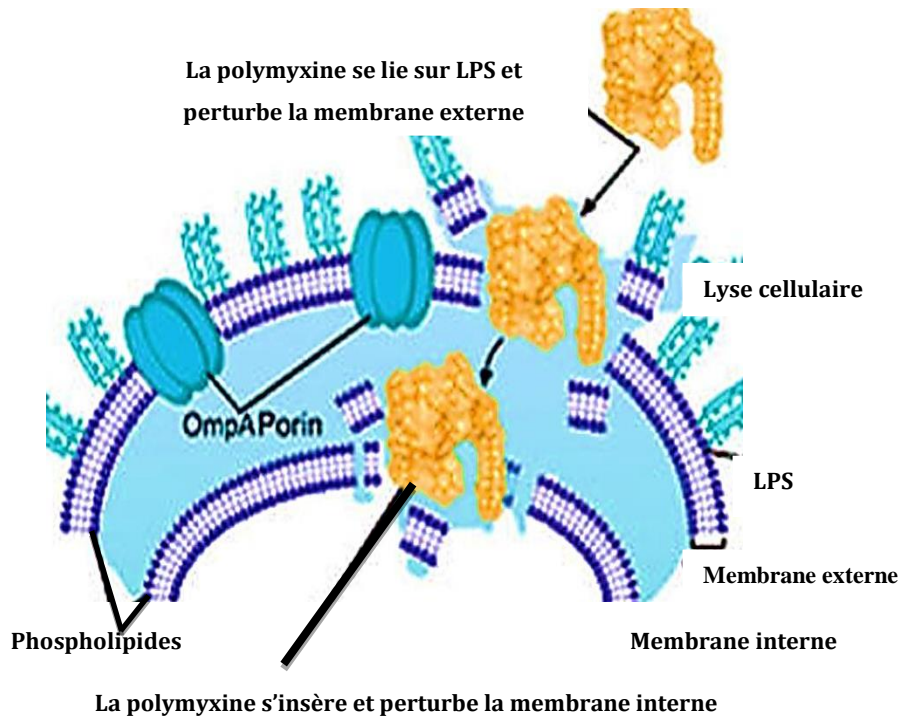


Figure 57 : Mode d'action de la polymyxine B contre BGN ciblant l'enveloppe externe (436).

Les valeurs critiques de la CMI de la colistine permettant de se prononcer sur le phénotype d'une bactérie, à savoir sa sensibilité (S) et sa résistance (R) est assujettie à des analyses différentes. En effet, selon le CA-SFM et le CLSI 2017, une souche est sensible à la colistine, si sa CMI pour cet antibiotique $\leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, elle est par contre résistante au même antibiotique, si sa CMI est $\geq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En revanche, selon les recommandations de la British Society for Antimicrobial Chemotherapy, une souche est sensible à la colistine si sa CMI est $\leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, elle est résistante si sa CMI est $\geq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (29, 437-439). Cependant selon Les recommandations du EUCAST 2017, une souche sensible à la colistine si la CMI est inférieure ou égale à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et une souche résistante à la colistine si la CMI $> 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (440-444).

Ainsi, les souches *E. coli* 184 et *E. coli* 289 ayant une CMI de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, lorsqu'elles sont traitées avec la solution S1, c'est à dire la colistine à $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$, auraient des phénotypes R (résistant). Concernant la souche *E. coli* ATCC 8739, elle a indiscutablement un phénotype S (sensible) à la colistine, selon les recommandations de la British Society et de l'EUCAST. A noter que l'apport des nanoparticules diminue la CMI de cette souche, déjà sensible à la colistine. Le résultat montre que la colistine est potentialisée par les nanoparticules car nous enregistrons une CMI de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. D'après les études antérieures, la résistance à la colistine est liée à des modifications de la composition du LPS

(Lipopolysaccharide) des bactéries à Gram-négatif. Ces modifications ont toutes comme conséquence de diminuer la charge négative du LPS, essentiellement *via* l'ajout de résidus chargés positivement, entraînant ainsi une diminution d'affinité de la colistine (elle-même chargée positivement) pour sa cible (445). La résistance de la souche 184 est une résistance plasmidique (gène *mcr-I*⁺). Cette résistance plasmidique chez les entérobactéries, principalement chez *E. coli*, a été détectée pour la première fois en Chine à la fin 2015 (93), elle est encore émergente en France et dans le monde. Elle représente un risque pour la santé publique car la colistine est l'un des rares antibiotiques encore actif sur les souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) principales Bactéries Hautement Résistantes émergentes (BHRe). En ce qui concerne la souche 289, celle-ci ne possède pas de gène *mcr-I* (441). Comme il a été rapporté dans la littérature, les souches avec le mécanisme de résistance *mcr-I* présentent un bas niveau de résistance, les CMI à la colistine étant habituellement comprises entre 4 et 8 µg.mL⁻¹ (446).

Selon Khan et al.2012, l'alginate est capable de potentialiser l'action des antibiotiques pour surmonter la résistance aux médicaments. Par ailleurs, la capacité des oligomères d'alginate à potentialiser l'activité des principales classes d'antibiotiques couramment utilisés en pratique clinique pour le traitement des infections causées par BGN a été établie (447). La combinaison des oligosaccharides G (OligoG) d'alginate (polymère linéaire composé de résidus de guluronate G) avec l'azithromycine a diminué la CMI de l'azithromycine pour *E. coli* V7 de 8 µg.mL⁻¹ à 0,5 µg.mL⁻¹, ce qui indique que la potentialisation avec l'OligoG avait déplacé la CMI de > 16 µg.mL⁻¹ (catégorie résistante) à ≤ 16 µg.mL⁻¹ (catégorie sensible), et la combinaison avec l'érythromycine a réduit la CMI de ce dernier pour *E. coli* V7 de 32 µg.mL⁻¹ à 4 µg.mL⁻¹ (447). Donc, d'après les résultats obtenus et les études de Khan et al. 2012, la combinaison de la colistine avec les nanoparticules d'alginate ont permis de diminuer la CMI de la souche *E. coli* ATCC 873. Sur la base des résultats de la quantification par HPLC et test d'activité antibactérienne, nous avons testé une solution de nanoparticules d'alginate + colistine dont la concentration en nanoparticules d'alginate est de 500 µg.mL⁻¹ et en colistine de 60 µg.mL⁻¹ sur 10 souches d'*E. coli* 184 (*mcr-I*⁺), *E. coli* 289 (*mcr-I*⁻), *E. coli* E5A16V (variant insensibilisé), *E. coli* E4A4V (variant insensibilisé), *E. coli* ATCC8739 (souche de référence), *E. coli* CIP7624 (souche de référence), *E. coli* SBS363 (LPS Tronqué), *E. coli* E5A16 wt (Souche de terrain), *E. coli* E4A4wt (Souche de terrain) et *E. coli* Top 10 (LPS⁻). L'activité antibactérienne de cette solution est déterminée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition et la mesure de la CMI en milieu liquide.

II-1-5) Résultats des activités anti-*E. coli* des solutions de colistine

Un antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. Les représentations graphiques des diamètres d'inhibition des 10 souches d'*E.coli* vis-à-vis de différentes solutions antibactériennes comportant la colistine sont regroupées dans le **tableau 18**. Les résultats obtenus montrent que le degré de sensibilité de chaque souche bactérienne vis-à-vis des solutions antibactériennes est différent. Les mesures des zones d'inhibition révèlent que :

- Toutes les souches d'*E. coli* sont sensibles aux deux solutions : colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et NPs alginate +colistine avec des zones d'inhibition différentes.
- La souche *E. coli* SBS 363 est la souche la plus sensible parmi les 10 souches testées. Le diamètre d'inhibition obtenu avec la solution NPs alginate+colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est de 28 mm alors qu'avec la solution colistine ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) il est de 24 mm, malgré que la concentration de la colistine dans les deux solutions soit de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ce qui signifie que la colistine avec les nanoparticules est plus active que la colistine seule à une même concentration.
- Les diamètres d'inhibition obtenus avec la souche Top 10 augmentent de 16 mm à 28 mm avec les deux solutions colistine ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et NPs alginate+colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivement. Malgré le fait que cette souche présente un LPS membranaire modifié, celle-ci au lieu d'être résistante est la plus sensible parmi les 10 souches testées.
- Les diamètres des zones d'inhibition des souches *E. coli* 184, *E. coli* 289, *E. coli* ATCC8739 et *E. coli* CIP 7624 avec la solution colistine ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sont négligeables (DI~0) par rapport aux diamètres d'inhibition de ces mêmes souches avec la solution NPs alginate+colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$), les diamètres avec cette solution sont respectivement, 6 mm pour *E. coli* 184, 8 mm pour *E. coli* 289, 8 mm pour *E. coli* ATCC8739 et 20 mm pour *E. coli* CIP 7624.

Tableau 18 : Diamètre d'inhibition des souches *Escherichia coli* avec la colistine.

Diamètre d'inhibition (mm)			
Souches	Colistine [500 µg.mL ⁻¹]	Colistine [60 µg.mL ⁻¹]	NPs Alg+Colistine [500 µg.mL ⁻¹ : 60 µg.mL ⁻¹]
<i>E. coli</i> 184	16	0	6
<i>E. coli</i> 289	26	0	8
<i>E. coli</i> E4A4 V	24	12	16
<i>E. coli</i> E5A16 V	12	8	10
<i>E. coli</i> ATTC8739	20	0	8
<i>E. coli</i> CIP 7624	28	0	20
<i>E. coli</i> SBS363	36	24	28
<i>E. coli</i> E4A4wt	10	2	4
<i>E. coli</i> E5A16wt	10	8	10
<i>E. coli</i> Top 10	20	16	28

D'après ces résultats, la combinaison de la colistine avec des nanoparticules d'alginate à une faible concentration a permis d'augmenter la sensibilité des souches d'*E.coli* à la colistine.

II-1-6) Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la colistine.

Les résultats issus de la détermination des CMI de la colistine par la technique de micro-dilution en milieu liquide sont représentés dans le **tableau 19**. Ces résultats montrent que 4 souches d'*E. coli* sont résistantes à la colistine, avec des CMI situées entre 4 et 16 µg.mL⁻¹, et que 6 souches d'*E. coli* sont sensibles à la colistine (CMI ≤ 2 µg.mL⁻¹), selon les recommandations de CLSI. En ce qui concerne les quatre premières souches d'*E. coli* (184, 289, E4A4 v, E5A16 v), les CMI avec la solution de colistine (500 µg.mL⁻¹) sont de 8 µg.mL⁻¹ pour 184 et 289 elle est de 16 µg.mL⁻¹ ainsi que pour E4A4 v et E5A16v. Tandis que ces concentrations sont diminuées à 4 µg.mL⁻¹ avec la solution de nanoparticules d'alginate +

colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ces souches restent résistantes à la colistine au vu des recommandations de l'EUCAST. Au contraire avec le CLSI, le comité français de microbiologie et British Society for Antimicrobial Chemotherapy, ces 4 souches sont devenues sensibles à la colistine suite à l'interaction avec la solution des nanoparticules d'alginate+colistine. Cependant, les CMI obtenues avec les souches sensibles sont diminuées de moitié avec la solution NPs alginate+colistine pour atteindre $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec la souche d'*E. coli* Top 10.

Tableau 19 : CMI de la colistine avec des NPs alginate vis-à-vis des souches *E. coli*.

Souches	Colistine [$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$] (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])	NPs Alg+Colistine[$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$] (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])
<i>E. coli</i> 184	8	4
<i>E. coli</i> 289	8	4
<i>E. coli</i> E4A4 V	16	4
<i>E. coli</i> E5A16 V	16	4
<i>E. coli</i> ATTC8739	2	1
<i>E. coli</i> CIP 7624	1	1
<i>E. coli</i> SBS363	2	1
<i>E. coli</i> E4A4wt	2	2
<i>E. coli</i> E5A16wt	2	2
<i>E. coli</i> Top 10	1	0,5

Selon les 4 références de Breakpoints, ces souches d'*E. coli* sont sensibles à la colistine. Leurs sensibilités ayant augmenté suite au traitement avec la solution des nanoparticules d'alginate + colistine.

Comme rapporté dans la littérature, plusieurs travaux ont décrit l'usage des oligosaccharides d'alginate dans le traitement de la mucoviscidose ([426](#), [447](#)) et ont démontré la capacité des OligoG d'alginate à modifier la charge de surface bactérienne et la croissance de biofilm de *Pseudomonas* spp. dans des modèles de culture/biofilms conventionnels ([447](#)). D'autre

part, une étude réalisée par Pritchard et al. 2017 (425) a montré que la combinaison de la colistine avec l'oligoG d'alginate de faible poids moléculaire perturbe la formation des micro colonies pseudomonales et améliore l'efficacité de la colistine dans la réduction de la biomasse des biofilms pseudomonaux, de même la colistine a conservé son activité antibiotique en présence d'alginate (425). On peut conclure que les nanoparticules d'alginate ont augmenté l'action antibactérienne de la colistine en diminuant sa CMI

II-1-7) Tests de cytotoxicité des NPs alginate+colistine

D'après la littérature, la toxicité neurologique et néphrologique potentielle de la colistine a conduit à restreindre son utilisation durant les 40 années qui ont suivi sa commercialisation. La néphrotoxicité de la colistine se manifeste essentiellement par une néphropathie tubulaire aigüe, à l'origine d'une diminution de la clairance de la créatinine, alors que la toxicité neurologique se manifeste lors de l'utilisation de posologies élevées par des paresthésies des extrémités et de la zone péribuccale, une fatigue, des vertiges, des troubles visuels, un syndrome confusionnel et un blocage neuromusculaire, pouvant conduire à une insuffisance respiratoire aigüe, voire à une apnée (29). Comme il a été rapporté dans l'étude de Naghmouchi et al. (2013), la colistine possède une toxicité de 100% pour les cellules Vero, a une concentration de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (448). Cependant, selon l'étude réalisée par Severino et al. en 2017 (449), l'encapsulation de la polymyxine dans des nanoparticules lipidiques solides permettent de diminuer la néphrotoxicité de cette dernière (449, 450). La cytotoxicité des différentes solutions a donc été testée sur deux types de lignées cellulaires humaines (HT-29) et porcines (IPEC-1). Les résultats obtenus sont présentés dans les **figures 58** et **59**. De manière générale, nous constatons que les nanoparticules d'alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sont totalement dépourvues d'effet cytotoxique avec un pourcentage de survie cellulaire d'environ 100%. De même, les différentes combinaisons avec les nanoparticules d'alginate ne sont pas toxiques pour les IPEC-1 ni pour les cellules HT-29. En ce qui concerne les résultats de la **figure 59**, le pourcentage de survie cellulaire avec les différentes solutions de la colistine ($500, 60, 40, 30,25, \text{ et } 7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est compris entre 97 et 100%. Ce qui signifie que ces concentrations en colistine n'ont pas d'effet délétère sur les cellules IPEC-1. On peut donc conclure que les concentrations en colistine utilisées ont un effet antibactérien élevé d'une part et d'autre part, ne sont pas toxiques pour les cellules porcines (IPEC-1).

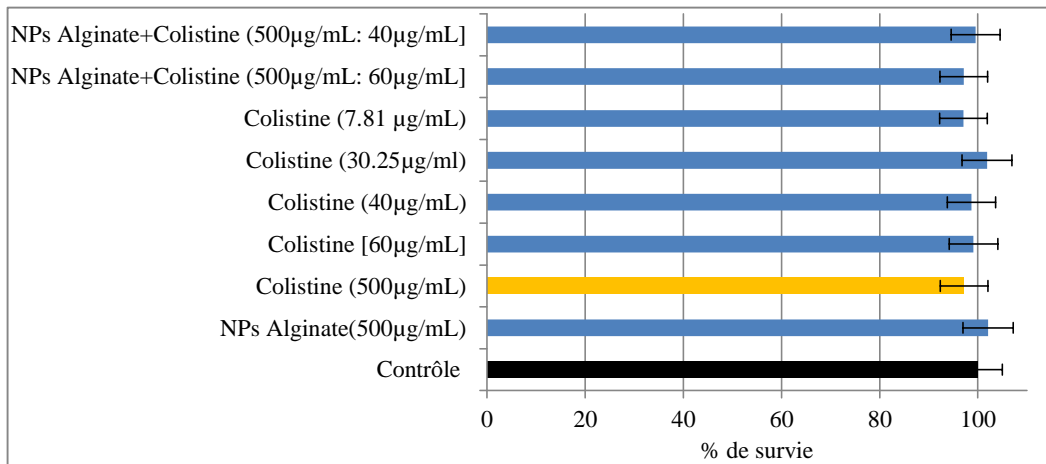


Figure 58 : Test de cytotoxicité des différentes solutions de la colistine sur la lignée cellulaire IPEC-1.

Cependant pour les cellules HT-29, parmi les 5 solutions de colistine testées, la solution colistine (500µg.mL⁻¹) présente un pourcentage de survie cellulaire inférieur à 80% (70,5%) par rapport aux autres solutions pour lesquelles le pourcentage de mortalité est inférieur à 3% (**Figure 59**).

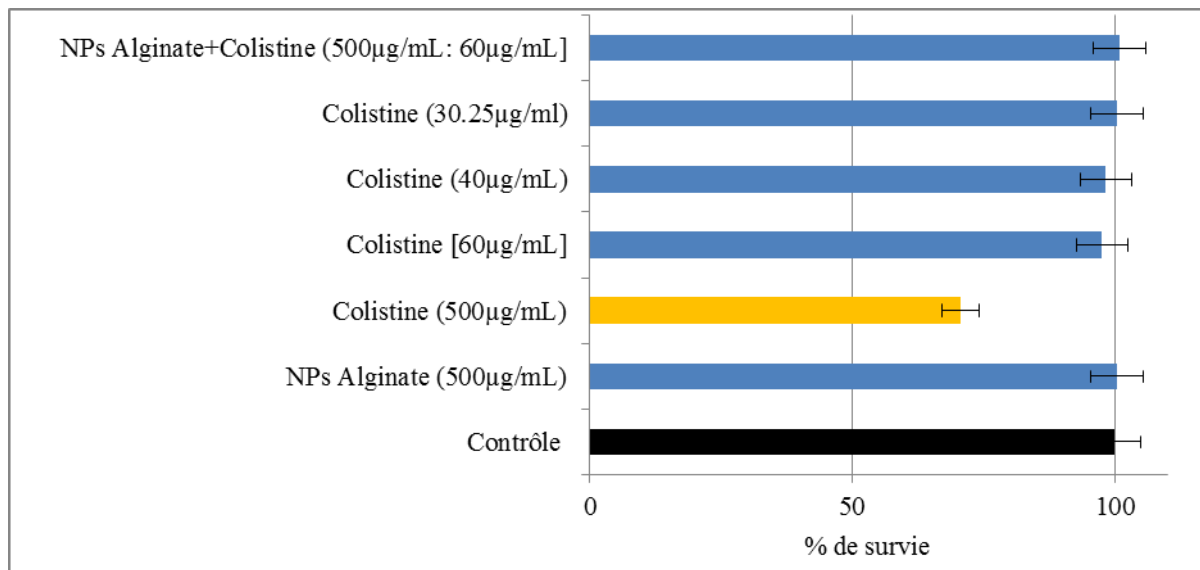


Figure 59 : Test de cytotoxicité des différentes solutions de la colistine sur la lignée cellulaire HT-29.

II-1-8) Dosage des protéines

L'interaction de la colistine avec la membrane bactérienne d'*E. coli* 184 provoque une altération de la membrane plasmique et engendre la fuite des contenus cytoplasmiques incluant les protéines intracellulaires. La combinaison de la colistine avec les nanoparticules d'alginate a un effet considérable sur la fuite membranaire de protéines par rapport aux

nanoparticules d'alginate (sans colistine) et la colistine seule. La **figure 60** illustre l'augmentation progressive de perte des protéines intracellulaires en fonction du temps d'incubation avec les nanoparticules, la colistine et les nanoparticules+colistine (cf. partie expérimentale V-3. : dosage des protéines, méthode QuantiPro[™] BCA). Le choix de la concentration de chaque solution a été fait selon la valeur de la CMI précédemment obtenue. La CMI de la solution de la colistine ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) étant de $8 \mu\text{g.ml}^{-1}$, la CMI de la solution des nanoparticules d'alginate+colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1} : 60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) étant quand à elle de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. On observe une augmentation progressive de perte de protéines par rapport aux nanoparticules d'alginate (sans colistine) et de la colistine. De même, les NPs Alginate + colistine ont également accéléré la fuite de protéines à travers la membrane d'*E. coli* 184.

Initialement, la fuite de protéines des cellules de l'expérimentation témoin (uniquement NPs alginate) s'élevait à $6,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$, alors que la fuite de protéines après traitement avec la colistine ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et NPs alginate + colistine ($500 \mu\text{g.mL}^{-1} : 60 \mu\text{g.mL}^{-1}$), est de $29,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $38,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. La fuite de protéines des cellules traitées avec la colistine augmente jusqu'à $77,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ après 5 heures d'incubation, contre $96,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$ après 5 heures d'incubation avec la solution des NPs alginate+colistine. La fuite de protéines lors de l'interaction avec la solution des NPs alginate+colistine est supérieure de $72,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à celle des nanoparticules (sans colistine) et de $19,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à celle de la colistine.

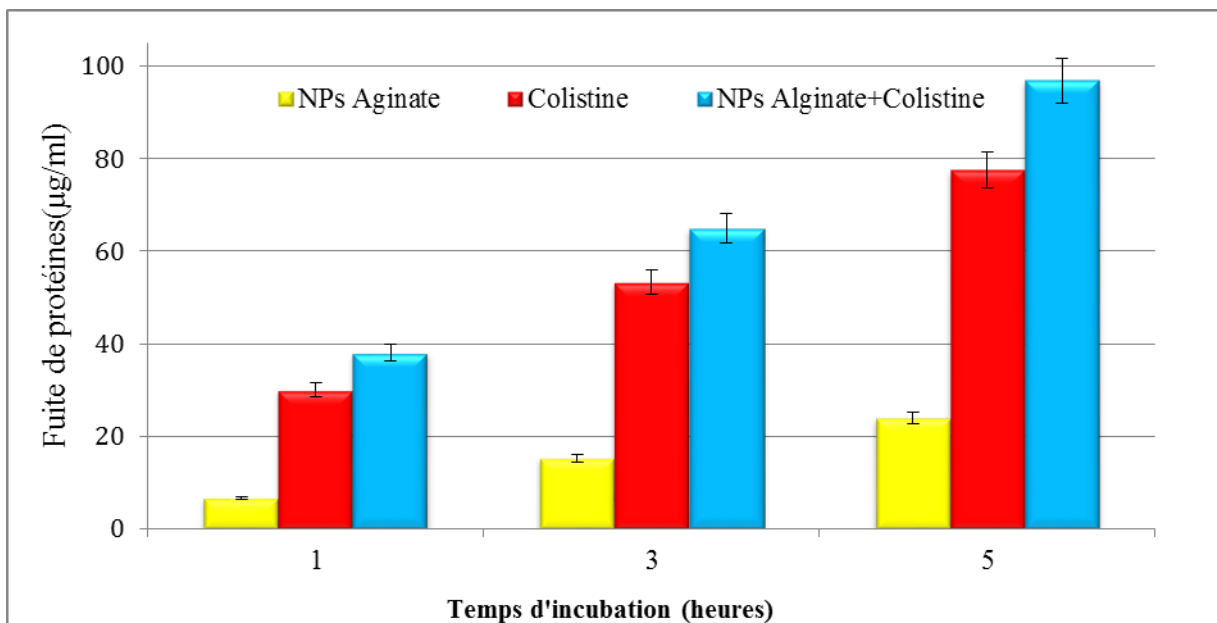


Figure 60 : Fuite de protéines d'*Escherichia coli*. Concentration en [Colistine] = $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, [NPs alginate] = $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, solution [NPs alginate+Colistine] = ($\text{CMI} = 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

La solution des nanoparticules alginate+colistine a un effet considérable sur la fuite de protéines par rapport à la colistine et les nanoparticules alginate. Après 5 heures d'incubation, la suspension des NPs alginate+colistine augmente la fuite de protéines, jusqu'à 304,9% comparativement aux NPs alginate (sans colistine) et 24,9% en comparaison avec la colistine (sans NPs alginate). Ainsi, le pourcentage de fuite de protéines est maximal lors de l'interaction avec la suspension NPs alginate+colistine par rapport aux NPs alginate et la colistine. La solution des nanoparticules d'alginate+colistine entraîne plus de perte de protéines que la solution colistine sans nanoparticules, ce qui indique une bonne activité antibactérienne de la colistine combinée avec les nanoparticules. Selon Dixon et al. (110), la polymyxine B ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), une molécule très proche de la colistine, a provoqué la libération de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de protéines intracellulaires au bout d'1 minute afin d'atteindre $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$ au bout de 45 minutes chez *E. coli*. La polymyxine B provoque la libération immédiate des protéines périsplasmiques, notamment les Béta-lactamases, et de la protéine cytoplasmique responsable des efflux de tétracycline dans les 5 minutes suivant l'exposition (110, 451). Au bout de 60 minutes d'exposition à la polymyxine, une libération concomitante de 68% des protéines intracellulaires est observée, telles que les Béta-galactosidase, la pyrophosphatase et l'aldolase (451, 452).

II-2) Combinaison de la colistine avec des NPs alginate et des polyamines

Les polyamines sont de petites molécules d'hydrocarbures aliphatiques avec des groupes azote quaternaires qui ont une charge nette positive à pH physiologique. Différents agents polyamino-antimicrobiens ont été conçus et leurs dérivés ont été classés selon deux classes principales appartenant aux stéroïdes ou non-stéroïdes. Au vu des résultats obtenus par l'analyse en HPLC, durant laquelle nous avons déterminé la quantité optimale de colistine adsorbée ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) à la surface des nanoparticules d'alginate, nous avons entrepris d'utiliser la colistine à une concentration de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et les polyamines (spermine, spermidine et piperazine) à une concentration de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

II-2-1) Tests d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des solutions des nanoparticules d'alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) +colistine ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + spermine, spermidine ou pipérazine ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sur la souche *E. coli* 184 a été déterminée par la mesure des diamètres d'inhibition (DI) et de la CMI. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 20**. Par rapport à la CMI des différentes solutions, la

solution ACSd présente la CMI la plus faible ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et la solution ACP présente la CMI la plus élevée ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La CMI de la solution ACP est 4 fois plus importante que la CMI obtenue avec la solution ACSd, ce qui signifie que la solution ACP est 4 fois moins active que la solution ACSd.

Tableau 20 : Activité antibactérienne des solutions des NPs alginate +colistine + polyamine sur *E. coli* 184.

Solutions	<i>E. coli</i> 184 (<i>mcr-1</i> ⁺)	
	DI (mm)	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Colistine	16	8
ACS	7	5
ACSd	12	2,5
ACP	6	10

ACS : NPs Alginate+Colistine+Spermine, ACSd : NPs Alginate+Colistine+Spermidine ; ACP : NPs Alginate+Colistine+Pipérazine.

En ce qui concerne l'activité de la solution ACS, la CMI obtenue est 2 fois plus grande que la CMI de la solution ACSd. Malgré la proximité de la spermine, qui est un dérivé de la spermidine par l'action de spermine synthétase, son activité est plus faible que cette dernière.

Différentes études antérieures ont démontré que la spermine a une activité antibactérienne contre une large gamme des BGP et à BGN. Par exemple, pour *E. coli* K-12, la CMI de la spermine est de 1 mM ($202,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$) alors que la CMI de la polymyxine B (une molécule proche de la colistine) est de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Par contre, la combinaison de la polymyxine B avec la spermine permet de diminuer la CMI de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. D'autre part, pour la souche *S. aureus* N315, la CMI de la spermine est de 4 mM ($809,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$) alors que celle de la vancomycine est de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La combinaison de ces deux molécules (spermine + vancomycine) permet de diminuer la CMI de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (453). Donc la spermine permet de potentialiser l'activité de différents antibiotiques en diminuant leur CMI vis-à-vis de certaines souches bactériennes. A la lumière de ces résultats, et comme la solution ACSd a la plus faible CMI, nous avons testé le mélange des nanoparticules d'alginate avec la colistine et la spermidine sur 184 à différentes concentrations. Le **tableau 21** résume les résultats des CMI obtenues par la technique de micro-dilution.

Tableau 21 : CMI des solutions ACSd avec *E. coli* 184.

	<i>E. coli</i> 184 (mcr-1 ⁺)
Solutions	CMI (µg.mL ⁻¹)
AC	4
ACSd ₁	3,75
ACSd ₂	5
ACSd ₃	5

AC: NPs Alg +colistine; ACSd₁: (500:30:30) µg.mL⁻¹; ACSd₂: (500:20:40) µg.mL⁻¹; ACSd₃: (500:10:50) µg.mL⁻¹.

Les résultats du **tableau 21** montrent que la solution ACSd1 a la plus faible CMI par rapport aux deux autres solutions testées, malgré la concentration plus faible en spermidine. En comparant l'activité anti-*E. coli* des solutions ACSd (tableau 20) et ACSd₁, la CMI la plus faible est celle de la solution ACSd (2,5 µg.mL⁻¹). La CMI de la solution ACSd a diminué de 5 µg.mL⁻¹ à 2,5 µg.mL⁻¹ en corrélation avec l'augmentation de la concentration de la spermidine de 20 µg.mL⁻¹ à 40 µg.mL⁻¹ (CMI ACSd <CMI ACSd₁ <CMI ACSd₂ ≤ CMI ACSd₃). Ce qui signifie que l'activité antibactérienne de la polyamine dépend de sa concentration.

D'après la littérature, les polyamines naturelles notamment la cadavérine, la putrescine, la spermidine et la spermine, constituent un groupe de composés cationiques omniprésents trouvés dans tous les organismes vivants. La spermine est présente dans les cellules eucaryotes, tandis que les autres sont présentes dans les cellules procaryotes et eucaryotes. Différents travaux ont démontré la capacité de la spermine et de la spermidine à bloquer la diffusion des solutés dans les porines d'*E. coli* et à agir comme modulateurs endogènes de la perméabilité de la membrane externe des bactéries (454), en induisant une résistance aux antibiotiques peptidiques cationiques, aux aminosides ou aux quinolones (455), et que certaines des polyamines telles que la cadavérine (456) ou la spermine(454) pourraient diminuer la perméabilité de la membrane externe des bactéries en étant des régulateurs naturels de l'activité des porines et, par la suite, réduisent la sensibilité bactérienne aux traitements antibiothérapie (457). Au contraire et d'une manière surprenante, il a été rapporté que les analogues de polyamines synthétiques, augmentaient la perméabilité de la membrane externe bactérienne en perturbant l'intégrité du LPS, entraînant une sensibilité accrue d'*E. coli*

aux antibiotiques hydrophobes (458). Il a été constaté que les polyamines au niveau millimolaire peuvent augmenter la sensibilité de *P. aeruginosa* à divers antibiotiques (459). Vaara et al. 1983 (460), ont observé un résultat discordant en utilisant des concentrations sub-millimolaires (460). Il est apparu que les polyamines pourraient être potentiellement utiles dans les thérapies anti-pseudomonales en augmentant l'efficacité de nombreux antibiotiques β -lactamines. En plus, une série d'amides de chloramphénicol (CAM) avec les polyamines (spermidine) ont été récemment synthétisées et sont parmi les agents antibactériens les plus puissants contre les souches bactériennes à Gram-positif (*S. aureus*) et à Gram-négatif (*E. coli*) (461, 462). Ensuite, de nombreux composés possédant un noyau de stérol ont été identifiés comme agents ayant des activités antibactériennes intéressantes, parmi ceux-ci la squalamine, un dérivé naturel de polyaminostérol isolé du requin *Squalus acanthias*, est active contre un large panel de micro-organismes présentant des CMI allant de 1 à 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contre les bactéries à Gram positif et négatif (463).

On peut conclure que les molécules de polyamines pourraient constituer une alternative thérapeutique efficace, en agissant sur la dépolarisation de la membrane et / ou en perturbant l'intégrité de cette dernière et pourraient considérablement réduire le développement de la résistance bactérienne.

II-2-2) Test de cytotoxicité des NPs alginate +colistine +spermine.

Les polyamines sont retrouvées chez la majorité des cellules animales et végétales, et sont des composants essentiels pour les fonctions et la division cellulaires, dont les cibles vont des acides nucléiques aux lipides nutritifs (464). Comme nous l'avons précisé auparavant, les polyamines principales (et les plus étudiées) sont la putrescine, la spermidine et la spermine. Afin de confirmer l'innocuité des deux solutions de spermine étudiées plus haut, un test de cytotoxicité a été effectué sur la lignée cellulaire HT-29 en présence des nanoparticules d'alginate. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 61**. Le pourcentage de survie des cellules HT-29 traitées avec les deux solutions incluant la spermine est supérieur à 100% (126% avec NPs Alginate +spermine et 125% avec la solution NPs alginate+colistine+spermine). En comparant le pourcentage de survie avec les deux solutions de NPs alginate+colistine sans spermine et la solution des NPs alginate + spermine sans colistine, on observe que le pourcentage de survie avec la spermine est de 125% alors qu'avec la colistine il est de 101%. Donc, la spermine au lieu d'altérer la survie cellulaire, stimule l'activité métabolique des cellules HT-29 et est donc dépourvue d'effet toxique. La majorité des études

antérieures ont montré que les polyamines (spermine et la spermidine) constituent une classe essentielle de métabolites présents dans tous les règnes du monde vivant et sont des facteurs de croissance et de prolifération cellulaire (465). Tandis que, d'autres études ont démontré que ces polyamines présentent des toxicités aiguës et subaiguës chez des rats. La spermidine et la spermine présentent chacune une toxicité orale aiguë à 600 mg/Kg de poids corporel. La spermine étant la plus toxique à une concentration de 200 ppm (19 mg/Kg) (466).

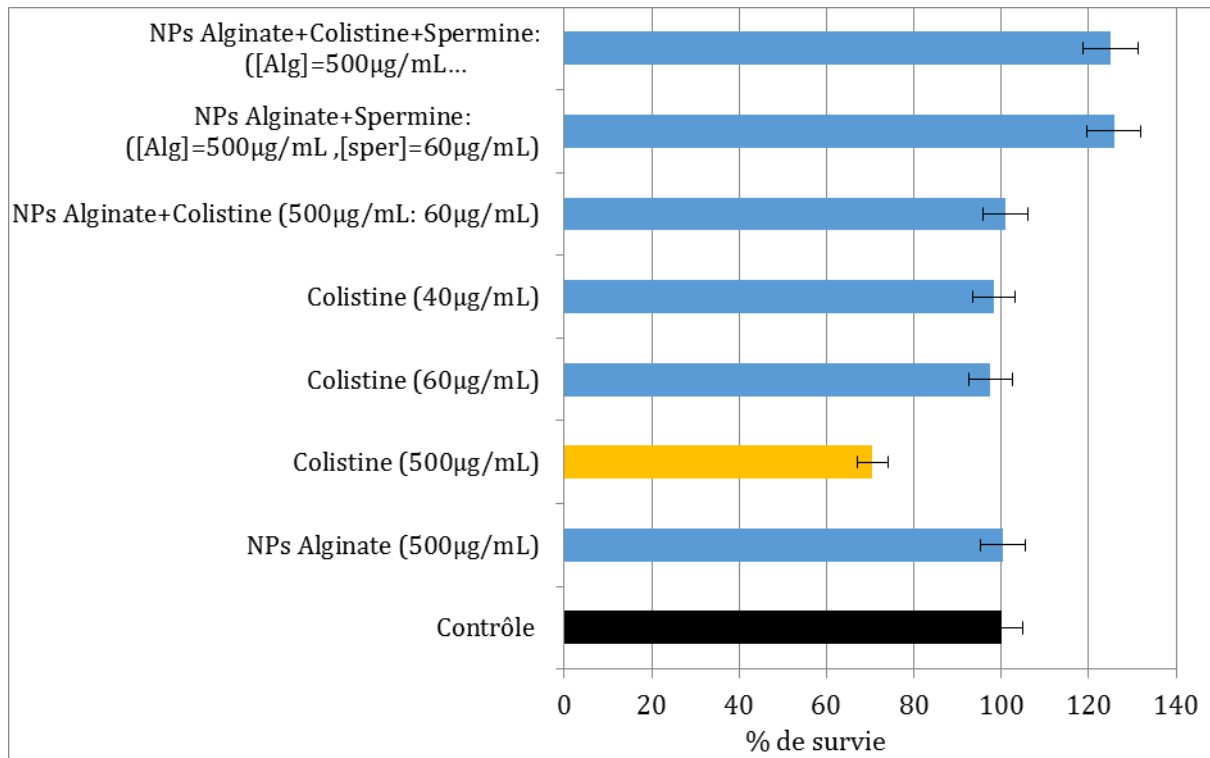


Figure 61 : Test de cytotoxicité des différentes solutions de la colistine et de la spermine sur la lignée cellulaire HT-29.

II-3) Combinaison de la colistine avec des NPs d'alginate et des huiles essentielles

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles ont un effet antimicrobien sur une large gamme de bactéries à Gram-positif (467) et à Gram-négatif (468, 469). Elle présentent un spectre d'activité plus large mais une inhibition moins forte que les antibiotiques (470). Dans notre étude, les huiles essentielles utilisées sont : le menthol, le carvacrol, le géraniol et le farnésol. L'activité antibactérienne de ces huiles essentielles a été déterminée par la technique de micro-dilution en milieu liquide avec la souche *E. coli* 184. Elles ont été testées en combinaison avec la colistine et les nanoparticules d'alginate à différentes concentrations. Avant de déterminer l'activité antibactérienne des différentes combinaisons

étudiées, le test de la cytotoxicité de différentes huiles essentielles à différentes concentrations a été effectué sur la lignée cellulaire HT-29.

II-3-1) Test de cytotoxicité des huiles essentielles.

D'après la littérature, les huiles essentielles sont de plus en plus utilisées en soin thérapeutiques et plusieurs études publiées concluent que certaines huiles essentielles peuvent avoir, dans certaines conditions, des propriétés antibactériennes, antifongiques ou virucides (471). Malgré ces propriétés, certaines huiles essentielles ont été testées sur des animaux (rats et souris) et ont provoqué une forte mortalité, de près de la moitié des animaux, à une DL₅₀ (dose létale à 50%) de 2 g/Kg (472). La **figure 62** présente les résultats de la cytotoxicité des 5 huiles essentielles. De façon générale, une concentration en huile essentielle de 10 µg.mL⁻¹ a un pourcentage de mortalité inférieur à 9%. Par contre, le pourcentage de survie cellulaire est inférieur à 70% pour une concentration en huile essentielle de 20 µg.mL⁻¹ et à une concentration de 40 µg.mL⁻¹, le pourcentage d'altération des cellules est supérieur à 75%. Ce qui signifie que la quantité maximale d'huiles essentielles que l'on peut utiliser sans toxicité apparente est de 10 µg.mL⁻¹.

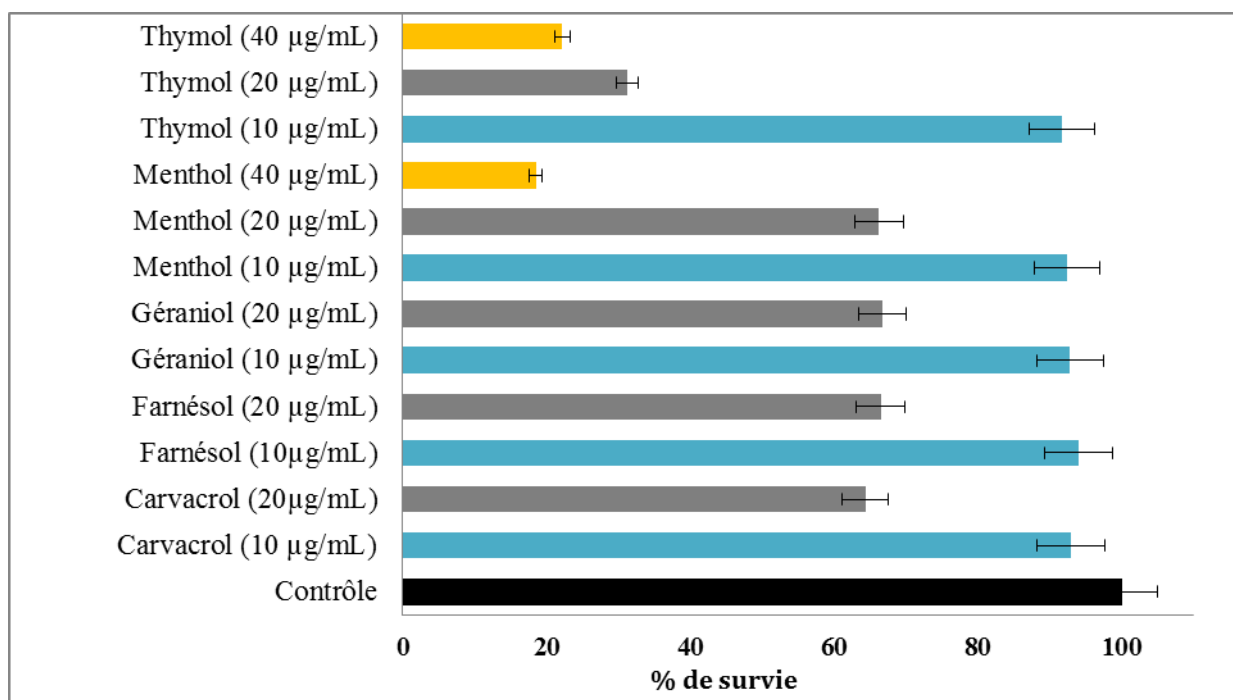


Figure 62 : Test de cytotoxicité des différentes huiles essentielles sur la lignée cellulaire HT-29.

Une étude a été réalisée pour évaluer la cytotoxicité de l'huile de lavande sur les cellules de peau humaine (473). Cette étude a démontré que l'huile de lavande est cytotoxique pour les

cellules de peau humaine *in vitro* (cellules endothéliales et fibroblastes) à une concentration de 0,25% (v / v) pour tous les types de cellules testées (HMEC-1, HNDF et 153BR) (473). De même, une autre étude a montré que les huiles essentielles de thym telle que l'eugénol, entraînent une insuffisance hépatique presque fatale chez les rats (474) et d'autres effets comme une irritation des muqueuses, des vomissements, des douleurs épigastriques, une diarrhée, des convulsions et une insuffisance rénale (475). Pour le moment, il y'a pas d'étude permettant de déterminer la concentration toxique de chaque huile essentielle. Alors, il est nécessaire de déterminer la concentration non toxique de chaque molécule de ce type avant utilisation et définir ainsi les doses adaptées permettant d'éviter les effets indésirables. D'après les résultats obtenus avec la lignée HT-29, la concentration qui ne présente pas d'effet toxique est de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, elle est alors retenue pour la suite des tests effectués avec les huiles essentielles.

II-3-2) Test d'activité antibactérienne

Le première huile essentielle a testée est le menthol, c'est un alcool monoterpénique et le composé essentiel de la menthe poivrée. Cette huile essentielle a des effets antibactériens modérés contre les BGP et BGN (470). Le menthol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a été testé en combinaison avec la colistine et les nanoparticules d'alginate. Les CMI's obtenues sont présentées dans la **figure 63**. De façon générale, la solution des nanoparticules d'alginate +menthol n'a pas d'effet antibactérien sur les deux souches d'*E. coli* testées (184 et ATCC 8739), ainsi que le menthol seul à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

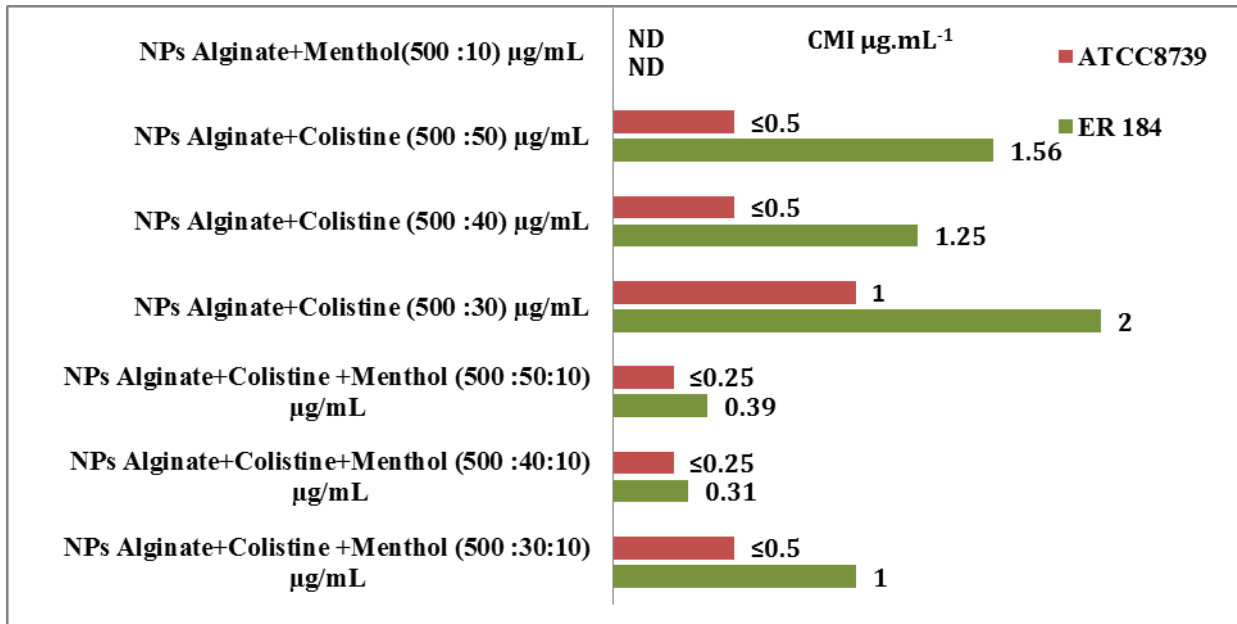


Figure 63 : CMI des différentes solutions obtenues sur les deux souches d’*E. coli* (184 et ATCC8739).

Concernant *E. coli* 184, les CMI de la colistine dans les solutions de nanoparticules d’alginate + colistine (sans menthol) varient entre 1,25 µg.mL⁻¹ et 2 µg.mL⁻¹. Par contre, les CMI varient entre 0,31 µg.mL⁻¹ et 1 µg.mL⁻¹ avec les solutions de nanoparticules d’alginate + colistine + menthol. Parmi les solutions des nanoparticules d’alginate +colistine, la solution NPs alginate + colistine (500 : 40) µg.mL⁻¹ présente la CMI la plus petite (CMI=1,25µg.mL⁻¹). Par contre, l’ajout du menthol (10 µg.mL⁻¹) dans cette même solution, diminue la CMI d’un facteur 4 (CMI=0,31µg.mL⁻¹). De même, la CMI (0,39 µg.mL⁻¹) de la solution des NPs alginate + colistine + menthol (500 :50 :10) µg.mL⁻¹ est 4 fois moindre que la CMI (1,56 µg.mL⁻¹) de la solution NPs alginate+colistine sans menthol (500 :50) µg.mL⁻¹. Ce qui signifie que la combinaison des solutions des nanoparticules d’alginate+ colistine avec le menthol a un effet potentialisateur sur l’activité de la colistine, l’ajout du menthol permettant d’augmenter la sensibilité de la souche *E. coli* 184 à la colistine. Pour la souche *E. coli* ATCC 8739, les CMI des différentes solutions des nanoparticules d’alginate + colistine sans menthol varient entre 0,5 µg.mL⁻¹ et 1 µg.mL⁻¹, alors que les CMI des solutions avec du menthol sont ≤ 0,5 µg.mL⁻¹. Ici aussi l’ajout du menthol a permis d’augmenter la sensibilité de la souche *E. coli* ATCC 8739 à la colistine d’un facteur deux. La souche *E. coli* ATCC8739 est une souche fécale, elle est utilisée pour tester l’efficacité des agents antimicrobiens et est sensible à la colistine (476).

D'après les résultats rapportés dans la littérature, le menthol a une activité antibactérienne et antifongique et possède également une forte signature sensorielle (470, 477). Ces propriétés sont exploitées dans divers produits, notamment les scellant dentaires, les antiseptiques, les conservateurs alimentaires et les suppléments alimentaires (478). Le menthol et tous les autres monoterpènes ont montré une activité antibactérienne à des degrés variables en inhibant la croissance des souches bactériennes avec des zones d'inhibition allant de 7 à 11 mm de diamètre. Cependant, cette activité était inférieure à celle de la pénicilline. Il a été démontré que le menthol est actif contre divers micro-organismes, notamment les BGP (*S. aureus*) et les BGN (*E. coli*) (479, 480). En outre, il a été démontré que le menthol et le *Mentha pipertia* ont un effet synergique avec l'oxytétracycline sur *S. aureus* (479). De nombreuses autres études ont confirmé l'activité antimicrobienne du menthol et ont également constaté que l'huile essentielle de *Mentha pipertia* et son composant principal, le menthol, présentaient l'activité inhibitrice la plus puissante contre deux souches de *Streptococcus pneumoniae* sensibles à de nombreux antibiotiques et contre deux autres résistantes. De plus, son association avec des antibiotiques connus tels que l'oxacilline, la norfloxacine ou l'érythromycine a entraîné des effets antibactériens synergiques (481).

Les effets toxiques sur la structure et la fonction de la membrane ont généralement été avancés pour expliquer l'action antimicrobienne des huiles essentielles et de leurs composants monoterpénoïdes. Une étude menée par Trombetta et al. a émis l'hypothèse que l'effet antimicrobien du menthol pouvait résulter d'une perturbation de la fraction lipidique de la membrane plasmique du microorganisme, entraînant une altération de la perméabilité de la membrane et une fuite des matériaux intracellulaires (480). Il a été également montré que le menthol a une activité antibactérienne plus forte envers *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (CMI=0,62 mg.mL⁻¹) qu'envers *E. coli* ATCC15221 (CMI= 2.5 mg.mL⁻¹) (480). Tandis que Inouye et al.2001, ont montré que le menthol présentait une activité modérée sur *S. aureus* avec une CMI allant de 6,3 à 50 µg.mL⁻¹ (482). D'autre part, Schelz et al (2006) ont démontré que l'huile de menthe poivrée et le menthol présentaient une activité antiplasmodique (479). Cependant, les mécanismes spécifiques impliqués dans l'action antimicrobienne des monoterpènes restent mal connus (483).

Au regard des résultats obtenus avec le menthol, trois autres huiles essentielles ont été testées, le carvacrol, le géraniol et le farnésol. Le choix de ces huiles essentielles s'appuie sur plusieurs études antérieures qui ont montré le degré d'efficacité de ces huiles dans la lutte

antimicrobienne (484). L'activité antibactérienne de ces huiles a été déterminée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition et par la mesure de la CMI sur la souche *E. coli* 184. La concentration en carvacrol, farnésol et géraniol est de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (cette concentration a été choisie suite aux résultats obtenus avec la solution NPs alginate + colistine+menthol (500 : 40 : 10) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ qui présente la CMI en colistine la plus faible). La concentration initiale en colistine dans chaque solution est de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et la concentration en nanoparticules d'alginate est de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les résultats obtenus avec ces 3 huiles essentielles sont présentés dans le **tableau 22**. Concernant les résultats des DI et des CMIs avec les 3 solutions NPs Alginate + Carvacrol (AC), NPs Alginate + Farnésol (AF) et NPs Alginate + Géraniol (AG). L'absence de zones d'inhibitions en milieu solide signifie que ces composées ne sont pas actifs. Les résultats de l'évaluation des CMIs de ces solutions montrent que la combinaison de ces huiles essentielles, à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, avec des nanoparticules d'alginate ne présentent pas non plus d'activité antibactérienne sur *E. coli* 184. Ce qui confirme qu'une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en huile essentielle (menthol, carvacrol, farnésol et géraniol) est inactive.

Tableau 22 : Activités antibactériennes des solutions des NPs alginate +colistine + huile essentielle sur *E. coli* 184.

Solutions	ER 184 (<i>mcr-1</i> ⁺)	
	DI (mm)	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
AC	0	ND
AF	0	ND
AG	0	ND
ACC	36	$\leq 0,62$
ACF	28	$\leq 1,25$
ACG	28	$\leq 1,25$

AC: NPs Alginate+ Carvacrol; **AF:** NPs Alginate+ Farnésol; **AG:** NPs Alginate + Géraniol; **ACC:** NPs Alginate+Colistine+Carvacrol, **ACF:** NPs Alginate+Colistine+Farnésol; **ACG:** NPs Alginate+Colistine + Géraniol.

En ce qui concerne les diamètres d'inhibition de la croissance d'*E. coli* 184 avec les 3 solutions, la solution ACC (NPs alginate + colistine + carvacrol) présente la plus grande zone d'inhibition (DI=36 mm) par rapport aux deux autres solutions testées, NPs Alginate+ Colistine + Farnésol (ACF) et NPs Alginate + Colistine + Géraniol (ACG). Ceci signifie que le carvacrol est plus actif que le géraniol et le farnésol. D'autre part, la concentration minimale inhibitrice de la solution ACC est la plus petite ($CMI \leq 0,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$), et est deux fois moindre que les CMI des solutions ACF et ACG. Ce qui indique que le carvacrol a une activité antibactérienne plus élevée que le farnésol et le géraniol, et sa combinaison avec la colistine a permis d'augmenter le pouvoir inhibiteur de la combinaison des nanoparticules d'alginate +colistine sur la croissance d'*E. coli* 184 en diminuant la CMI de l'antibiotique. Donc, la souche 184 est devenue plus sensible à la colistine lorsque celle-ci est associée avec des nanoparticules d'alginate et des huiles essentielles. Cette sensibilité dépendant de la nature de l'huile essentielle utilisée. Plusieurs études antérieures ont démontré l'activité antibactérienne du carvacrol (485), du farnésol (486), du géraniol (487), et de l'eugénol (488); chaque huile essentielle ayant une activité thérapeutique spécifique. Cette activité dépend de sa nature et de sa composition chimique (phénol, alcool, cétone, aldéhyde,..). Plusieurs molécules phénoliques, telles que le carvacrol et le crésol, exercent une activité bactéricide en provoquant l'altération des membranes bactériennes et la perte des métabolites intracellulaires (489, 490). Dans la littérature, certaines études ont montré que les composants à structure hydroxyle phénolique, tels que l'eugénol et le thymol, possèdent certaines activités antimicrobiennes en tant qu'agents bactéricides ou bactériostatiques contre les BGP et BGN, ainsi que contre les levures. Par ailleurs, l'eugénol présente un effet synergique avec la colistine et renforce son activité antimicrobienne contre les souches d'*E. coli* résistantes à la colistine, à une concentration de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. L'eugénol peut également présenter un effet clinique lorsqu'il est associé à la colistine *in vitro* (488).

Le carvacrol est un phénol monoterpénique, isomère de thymol. Il est caractérisé par ses actions bactériostatique et bactéricide sur un large spectre de BGP comme *S. aureus*, *S. epidermis* et des BGN comme *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *K. pneumoniae* (471, 483, 491). Selon Xu et al (2008) (492), le carvacrol et le thymol ont un effet antibactérien sur *E. coli*. Ces effets antibactériens ont été attribués à leur capacité à perméabiliser et à dépolariser la membrane cytoplasmique en raison de sa structure hydrophobique. La présence du groupe hydroxyle libre sur le carvacrol joue un rôle important dans la dépolarisation du potentiel membranaire (493), ce qui est essentiel à son activité antibactérienne, lui permettant d'agir comme un protonophore (494). Ainsi il s'introduit dans la membrane cytoplasmique, modifie les

propriétés physiques et chimiques de cette dernière et affecte à la fois l'ordre des lipides et la stabilité de la bicouche, entraînant une augmentation du flux passif de protons à travers la membrane (494). Une autre étude a montré que le carvacrol permet de diminuer le pool d'ATP intracellulaire d'*E. coli* et permet également une augmentation de l'ATP extracellulaire, en induisant une action perturbatrice sur la membrane cytoplasmique (361).

Par ailleurs, différentes études ont démontré que le géraniol augmentait de manière significative l'efficacité des β -lactames, des quinolones et du chloramphénicol (495). Selon Loren et al. 2009 (495), le géraniol permet de rétablir de manière significative la sensibilité de la souche *Enterobacter aerogenes* EAEP289 multi-résistante, en diminuant de 16 fois la CMI vis-à-vis du chloramphénicol passant de 1024 mg.L⁻¹ à 64 mg.L⁻¹ avec le géraniol. Cette étude a montré également que le géraniol a un effet synergique avec les β -lactames, la fluoroquinolones et la norfloxacine. Ce qui signifie que le géraniol a un effet pléiotrope sur le phénotype MDR chez *Enterobacter aerogenes* et qu'il présente un effet inhibiteur sur différents mécanismes impliqués dans la résistance de cette bactérie (495). Donc le géraniol possède un grand potentiel thérapeutique, et représente une nouvelle source de médicaments pouvant aider au traitement d'infections dues à des bactéries MDR, et pourrait également aider à mieux comprendre la résistance multiple aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif qui continuent de menacer la santé publique. Il a été démontré, par ailleurs, que le farnésol peut être utilisé comme agent antimicrobien en inhibant la croissance de certains microorganismes, tels que les agents pathogènes humains *S. aureus* (496, 497) et *Strept. mutans* (498). Selon Brehm et al. (499), le farnésol a la capacité d'augmenter la perméabilité et la sensibilité bactérienne à un certain nombre d'antibiotiques. Ainsi le farnésol a pu rétablir la sensibilité de souches d'*E.coli* à la polymyxine. Selon Chi et al. (2018), l'activité antibactérienne synergique entre le farnésol et la polymyxine B contre les bactéries à BGP, telle que *S. aureus* LMGT 3242, été démontrée avec une CMI de 0,6 mM de farnésol (500). Une autre étude a révélé que le farnésol peut être un bon adjuvant de la colistine sur *A. baumannii* (501). Cette étude a également mis en évidence que la combinaison de la colistine avec le farnésol augmente la sensibilité à la colistine de souches résistantes à cet antibiotique. Le farnésol peut augmenter l'activité de la colistine en perturbant la membrane externe et en augmentant ainsi la capacité de la colistine à se lier et à solubiliser les lipides membranaires (501, 502). En conclusion, les huiles essentielles sont des produits naturels, peu coûteux, permettant d'inhiber et d'éliminer les agents pathogènes résistants aux antibiotiques, en augmentant l'efficacité des traitements antimicrobiens et en réduisant l'évolution de la résistance. Leur association avec des agents antimicrobiens permet d'augmenter la

perméabilité bactérienne et faciliter l'activité des antibiotiques. Chaque huile essentielle a un spectre d'activité spécifique, qui dépend de sa composition chimique. Il y a des composés dont l'activité est importante sur des BGN et d'autres qui ont une activité importante plutôt sur des BGP. Par conséquent, le carvacrol, le farnésol et le géraniol pourraient renforcer les effets antibactériens de la colistine dans les souches à la fois résistantes et sensibles à la colistine. Les résultats ci-dessus ont clairement démontré que ces composés présentaient un puissant effet antibactérien et une activité synergique lorsqu'ils étaient utilisés en combinaison avec d'autres molécules sur la souche *E. coli* résistante à la colistine.

II-3-3) Test de la cytotoxicité des NPs alginate + colistine + huile essentielle

Le test de la cytotoxicité des différentes combinaisons des nanoparticules d'alginate + colistine avec les différentes huiles essentielles a été effectué sur la lignée cellulaire HT-29. La **figure 64** présente les résultats obtenus. De façon générale, les solutions des différentes combinaisons ont un pourcentage de survie supérieur à 92%. Le pourcentage de survie avec les solutions de nanoparticules d'alginate + huile essentielle (menthol/ carvacrol/ farnésol ou géraniol) sans colistine est de 92 à 97% alors que le pourcentage de survie avec les solutions en présence de colistine est de 93 à 100%. Ce qui signifie que l'ajout des huiles essentielles à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ne présente pas d'effet toxique sur la lignée cellulaire HT-29.

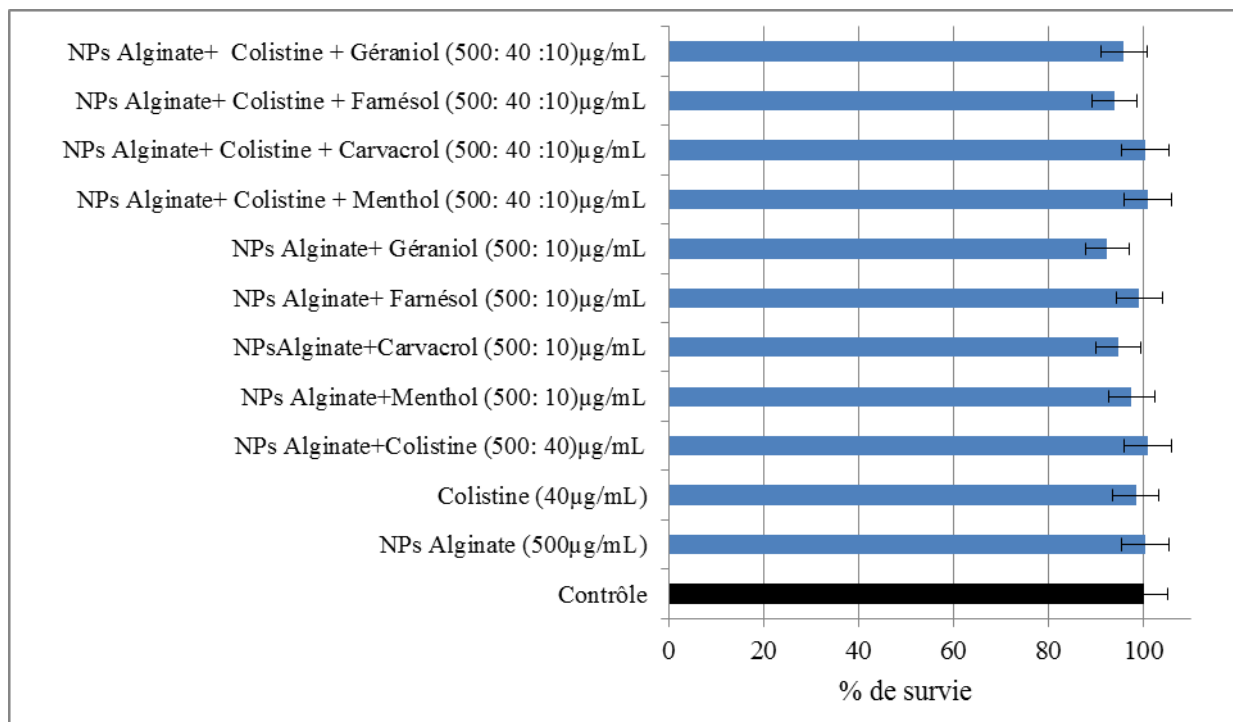


Figure 64 : Test de cytotoxicité des différentes combinaisons des NPs alginate + colistine + huiles essentielles sur la lignée cellulaire HT-29.

D'après ces résultats de la **Figure 64** et ceux obtenus plus haut (cf.II.2.1 test de la cytotoxicité des huiles essentielles), les différentes combinaisons des nanoparticules d'alginate avec la colistine et les huiles essentielles ne présentent pas d'effet toxique pour la lignée cellulaire HT-29.

II-4) Combinaison de la colistine avec des NPs alginate et l'acide lactique

Dans cette partie, nous avons testé la combinaison de la colistine avec les nanoparticules d'alginate et l'acide lactique sur deux souches d'*E. coli* 184 (*mcr-1+*) et ATCC8739. L'activité antibactérienne de la solution NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + colistine ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + acide lactique ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est déterminée par la technique de micro-dilution en milieu liquide (CMI).

II-4-1) CMI de la colistine +NPs alginate + A. lactique

Le **tableau 23** présente les résultats obtenus. En ce qui concerne l'activité de la solution d'acide lactique ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$), la CMI de cette solution sur les deux souches d'*E. coli* testées (184 et ATCC8739) n'est pas déterminée. En effet cette solution à cette concentration n'inhibe pas la croissance bactérienne, elle a une activité antibactérienne négligeable.

Tableau 23 : CMI des différentes solutions d'acide lactique sur 2 souches d'*E. coli*.

Solution	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	<i>E. coli</i> 184	<i>E. coli</i> ATCC 8739
Acide lactique ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	ND	ND
NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,25	$\leq 0,5$
NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Acide lactique ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	$\leq 0,62$	$\leq 0,5$

*ND : Non Déterminée

Par ailleurs, en comparant les valeurs de la CMI de la solution des nanoparticules d'alginate + colistine + acide lactique et celle de la solution des nanoparticules d'alginate + colistine sans acide lactique, on observe que la CMI est diminuée de moitié en présence de l'acide lactique pour les deux souches testées. Ce qui signifie que l'acide lactique a un effet potentialisateur sur les mélanges antibactériens testés. Les acides organiques sont utilisés dans les aliments comme agents de conservation pour renforcer leur sécurité microbiologique (370, 503). L'efficacité des acides organiques varie beaucoup selon le type d'acide ou le mélange d'acides utilisé (504). Selon Lajhar et al. 2017 (505), les acides organiques peuvent être utilisés dans l'industrie de transformation des produits carnés bovins pour réduire la contamination bactérienne. Il a été ainsi montré que l'acide acétique, l'acide propionique puis l'acide lactique suivis de l'acide citrique présentent des CMI de 1024, 1024, 2048 et 4096 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement sur *E. coli* O26. D'autre part, Molena et al. 2005 (506) ont montré que l'acide citrique et l'acide acétique exercent un effet antibactérien et réduisent le développement d'*E. coli* producteur de vérotoxine. Une autre étude a révélé que les acides organiques (acide acétique et citrique) peuvent jouer un rôle dans l'inhibition des isolats d'*E. coli* O157 (507). Par ailleurs, des études ont rapporté que les acides organiques (acides acétique, citrique, lactique, malique, propionique et tartrique entre autres) constituent une alternative potentielle pour endiguer les épidémies de salmonelles dues à la consommation de viande et de produits à base de volailles (508, 509). Selon Kashket et al. 1987 (510), l'inhibition de la croissance microbienne par les acides organiques s'expliquerait par la capacité de ces acides de traverser la membrane cellulaire, de se dissocier à l'intérieur à pH plus alcalin et d'acidifier le cytoplasme cellulaire (422). Hsiao et al. 1999 (511) ont retrouvé

des CMI pour l'acide acétique, butyrique, lactique et caprylique pour *E. coli* inférieures à 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Toutefois, cette même bactérie est environ 10 fois plus résistante à l'acide malique, à l'acide tartrique et à l'acide citrique. Les acides organiques peuvent donc représenter des alternatives thérapeutiques efficaces pour traiter certaines infections bactériennes.

II-4-2) Test de la cytotoxicité des NPs alginate + colistine + acide lactique

La **figure 65** présente les résultats obtenus. De façon générale, le pourcentage de survie avec la solution de nanoparticules d'alginate + acide lactique avec colistine est de 95% et 98% avec les deux lignées cellulaires (IPEC-1 et HT-29) respectivement. Le pourcentage de survie avec la solution d'acide lactique ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diminue de 100 à 27% avec HT-29 et de 100 à 46% avec IPEC-1, alors qu'à $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec les deux celle-ci est de 93 à 100%, ceci même en présence de colistine. Ce qui signifie que l'acide lactique d'une concentration de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ n'est pas toxique sur les deux lignées cellulaires HT-29 et IPEC-1.

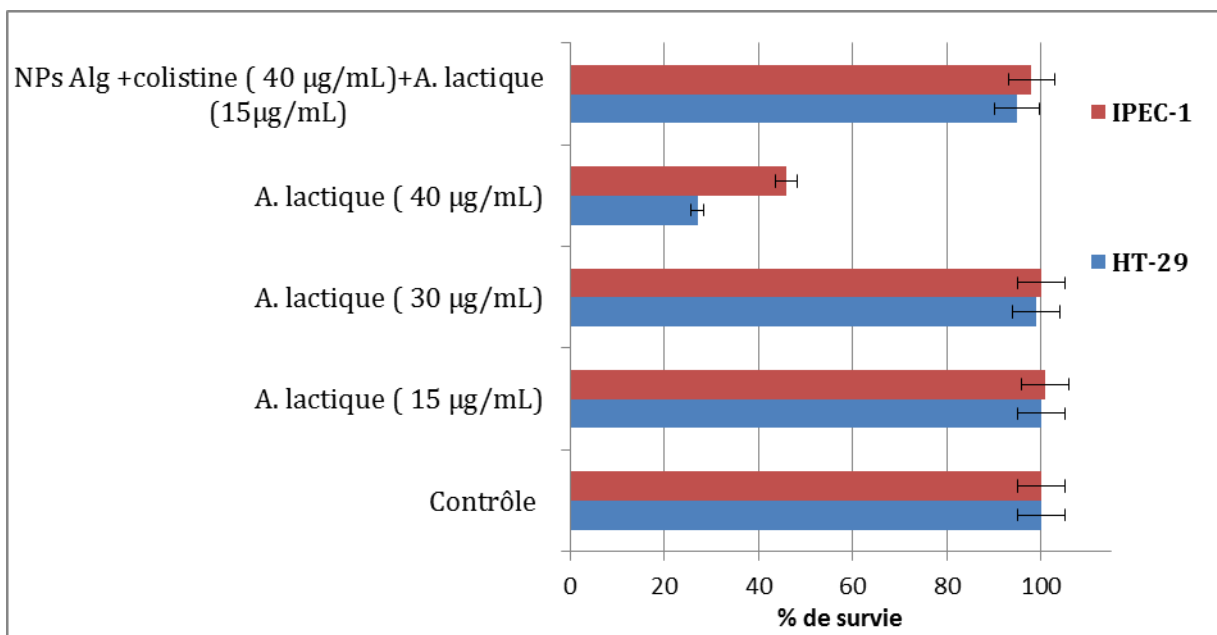


Figure 65 : Test de cytotoxicité de la combinaison de la colistine+NPs alginate + acide lactique sur les deux lignées cellulaires IPEC-1 et HT-29.

II-5) Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide de la colistine dans des différentes combinaisons

Pour définir le caractère bactériostatique ou bactéricide de la colistine, il faut calculer le rapport entre la CMB et la CMI, $R=CMB/CMI$. La CMI est une valeur indicative de l'activité bactériostatique et la CMB est une valeur indicative de l'activité bactéricide de l'antibiotique. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 24**.

Tableau 24 : CMI et CMB des différentes solutions de la colistine avec la souche *E. coli* 184.

Solutions	<i>E. coli</i> 184 (mcr-1 ⁺)		
	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMB/CMI
Colistine (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	8	8	1
NPs alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,25	5	4
NPs alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Menthol (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,31	0,62	2
NPs alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Acide lactique (15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$\leq 0,62$	1,25	2

Les résultats montrent que les valeurs de la CMI et la CMB de la solution colistine (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sont équivalentes, alors que la CMB (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de la solution NPs alginate+colistine est 4 fois supérieure à la CMI (1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et que les valeurs de la CMB obtenues avec les autres solutions sont 2 fois plus importantes que la valeur des CMIs. Différentes études ont déterminé la valeur du rapport CMB/CMI pour distinguer les antibiotiques bactéricides des antibiotiques bactériostatiques. Si $CMB/CMI < 2$, l'effet est bactéricide, et si CMB/CMI est très éloignée de la CMI, l'effet est alors bactériostatique (512). Par contre, d'autres références indiquent que si $CMB/CMI=4$ l'antibiotique est bactéricide, et si $CMB/CMI=8-16$ alors l'antibiotique est bactériostatique et si $CMB/CMI=32$ la bactérie est tolérante à l'antibiotique (16, 513). Si on se base sur la première hypothèse, $CMB/CMI < 2$, on trouve que les solutions testées, à l'exception de la solution NPs alginate + colistine, ont un effet bactéricide et cette dernière a un effet bactériostatique. Alors que, selon la deuxième hypothèse, toutes les solutions antibactériennes ont un effet bactéricide ($CMB/CMI=4$). D'après la littérature, la colistine est rapidement bactéricide contre les

espèces à Gram négatif, dont *E. coli*, mais pas sur les bactéries à Gram positif (514, 515). Les valeurs de la CMI et de la CMB de la colistine vis-à-vis d'*E. coli* étant ici équivalentes (516).

II-6) Courbe de mortalité d'*E.coli* 184

Pour évaluer les effets antibactériens des solutions de la colistine avec des nanoparticules d'alginate en présence du menthol et de l'acide lactique sur la souche *E. coli* 184, la mesure de la réduction du nombre de CFU/mL en l'espace de 8 heures a été effectuée. Comme le montre la **figure 66**, la colistine est bactéricide, elle a empêché la repousse des bactéries d'*E. coli* 184 en moins de 8 heures.

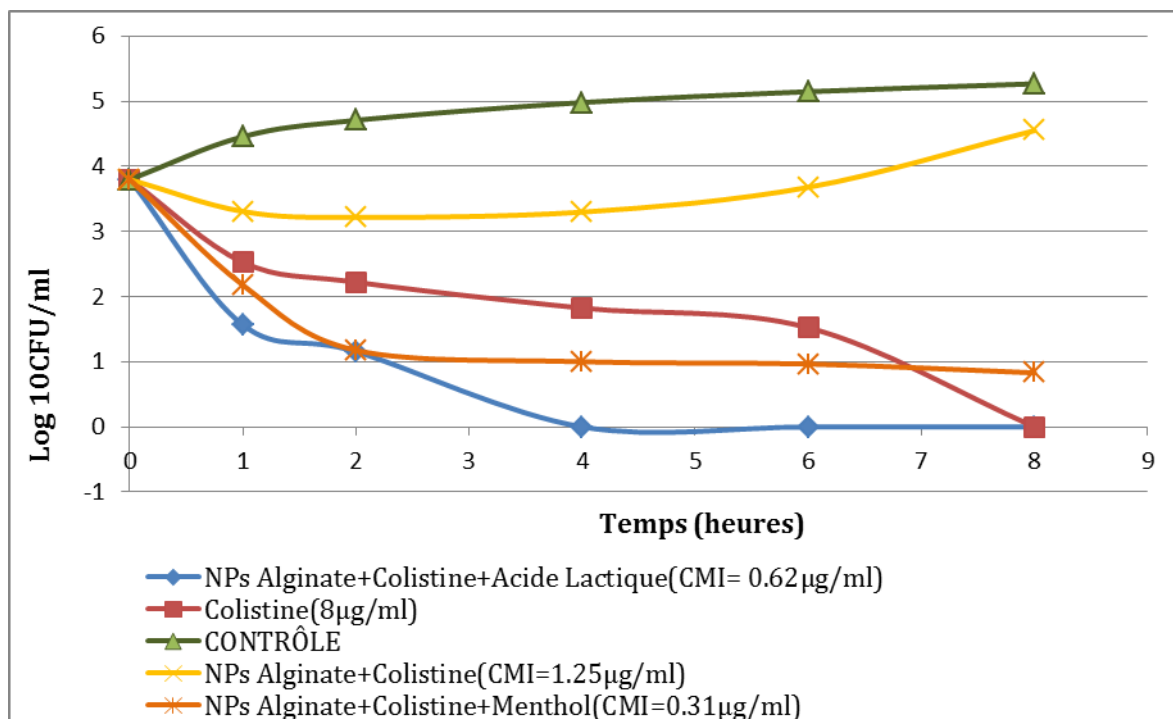


Figure 66 : Effet des différentes solutions de colistine sur la viabilité des souches d'*E. coli* 184.

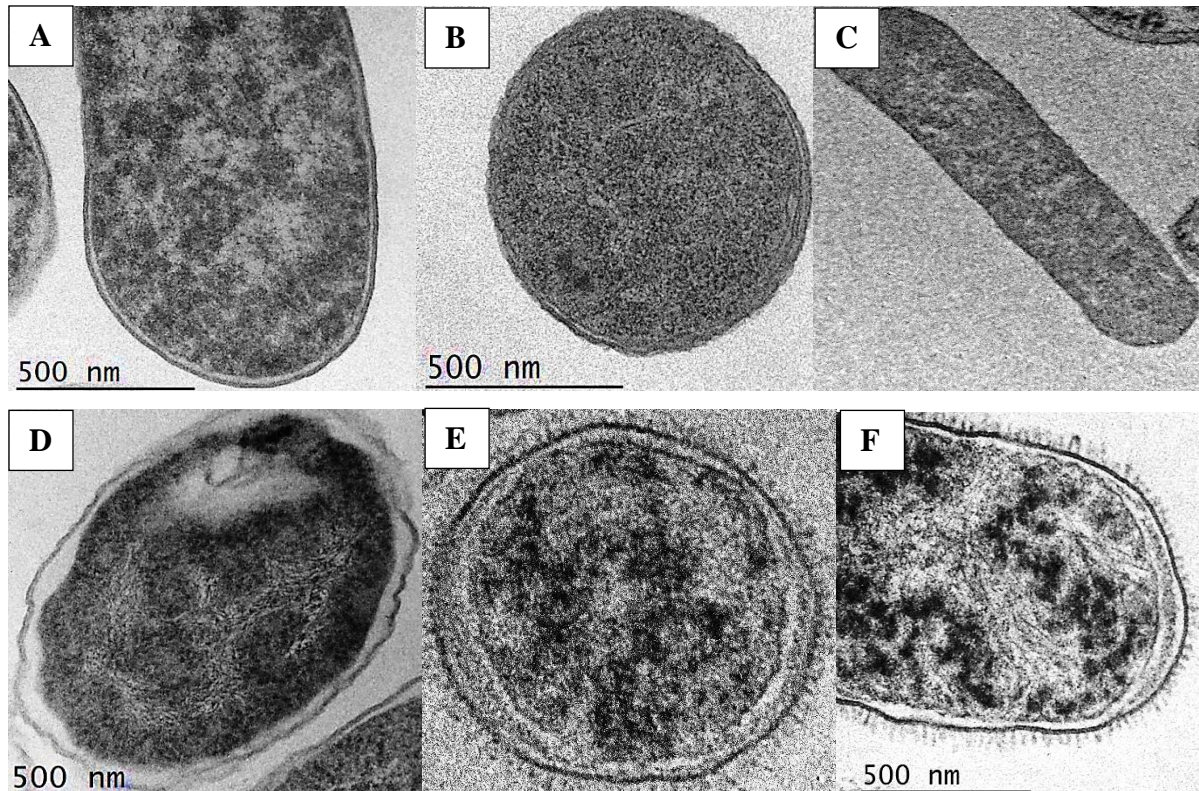
En revanche, la combinaison NPs alginate + colistine réduit la population *E. coli* 184 de 4 log₁₀ CFU/mL à 3,2 log₁₀ CFU/mL, mais une repousse a été observée après 4 heures. La souche *E.coli* 184 était sensible à ce mélange mais n'a pas été éradiquée. En outre, les combinaisons NPs alginate + colistine + menthol et NPs alginate + colistine + acide lactique ont augmenté l'effet bactéricide de la colistine, entraînant une amélioration substantielle de la destruction des bactéries jusqu'à 1,1 log₁₀ CFU/mL au bout de 2 heures. Ainsi, la combinaison NPs alginate + colistine + acide lactique est la combinaison la plus efficace parmi les 3 combinaisons testées, puisqu'elle a entraîné une réduction du nombre de bactéries à un niveau >0,5 log₁₀ CFU/ml au bout de 3 heures par rapport à celle avec la colistine (>1,8

log 10 CFU/mL) et avec le menthol (1 log 10 CFU/mL). Donc la combinaison de la colistine avec les nanoparticules d'alginate et l'acide lactique ou le menthol a un effet bactéricide.

Comme il a été rapporté dans la littérature, la colistine a une activité bactéricide rapide liée à son action perméabilisant sur la membrane cellulaire à la suite d'une absorption et une force électrostatique avec la membrane bactérienne (517). Son association avec certaines huiles essentielles, caractérisées par leurs activités bactéricides contre les souches d'*E. coli* (518), permet une potentialisation de son action destructrice rapide au cours de la première heure des tests de courbes de mortalité au cours du temps (519).

II-7) Imagerie par Microscopie Electronique à Transmission (MET)

La MET a été utilisée pour étudier l'intégrité de la membrane et les altérations intracellulaires possibles des cellules d'*E. coli* avant et après traitement avec les différentes solutions antibactériennes. L'observation par MET d'*E. coli* 184 traitée avec des solutions de la colistine en combinaison avec des nanoparticules d'alginate et en présence de l'acide lactique et/ou de menthol montre des changements morphologiques à la surface et à l'intérieur de la bactérie qui sont absents chez les bactéries non traitées.



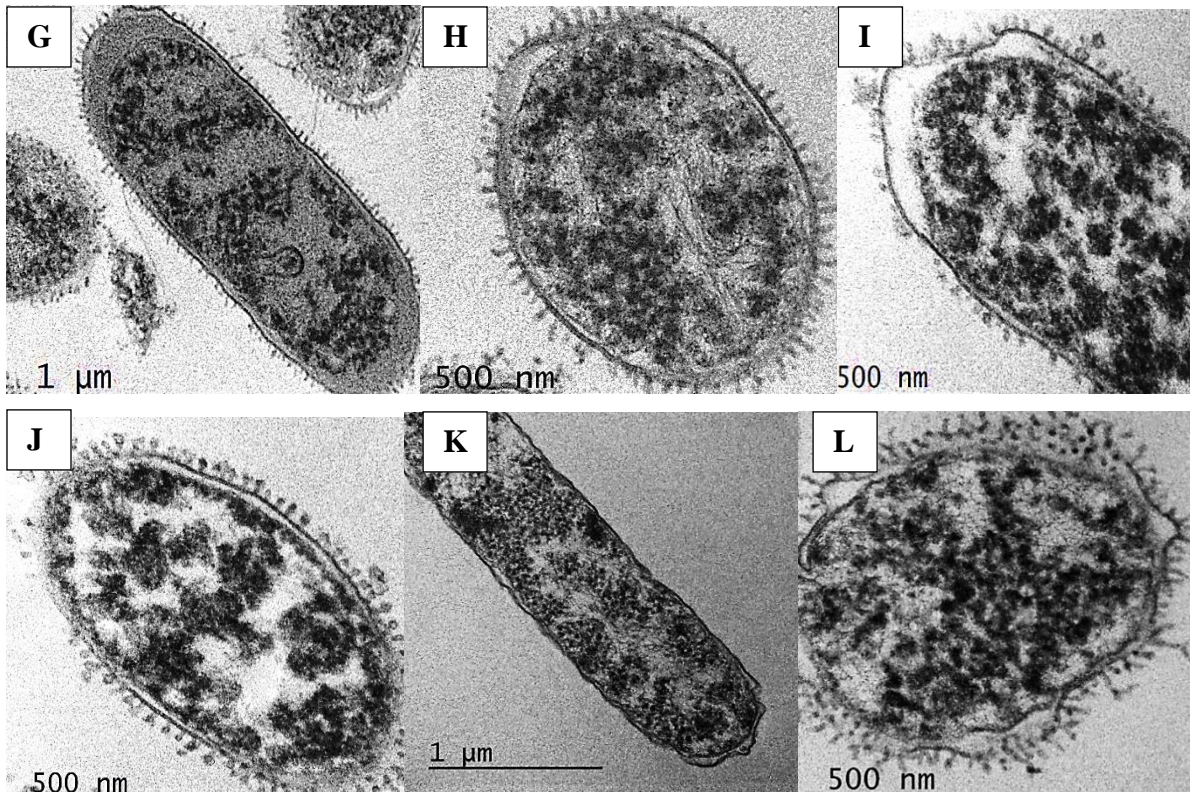


Figure 67 : Micrographies électroniques à transmission d'*E. coli* 184 traitée avec différentes solutions. **A-C** : Contrôle ; **D** : NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **E-F** : Colistine; **G-H** : NPs alginate+colistine ; **I-J** : NPs alginate+ colistine+acide lactique ; **K-L** : NPs alginate + colistine + menthol.

Comme le montre la **figure 67**, les cellules « contrôle » analysées par MET, sans traitement antimicrobien, ont préservé leur morphologie i.e. maintien de l'intégrité de leur paroi cellulaire, un contenu cytoplasmique dense aux électrons, et la présence de ribosomes et le matériel génétique distribué dans le cytoplasme bactérien (**Fig. 67 A, B** (coupe transversale) et **C** (coupe longitudinale)). Alors que les cellules d'*E. coli* traitées avec les solutions antibactériennes présentent une perturbation de la structure de leur paroi et de leurs contenus cellulaires. On peut voir que les cellules bactériennes traitées avec les NPs d'alginate présentent une zone claire évidente au sein du cytoplasme ainsi qu'une intégrité membranaire perturbée avec la formation de pores. L'analyse MET montre que toutes les cellules d'*E. coli* 184 traitées par la colistine présentent une condensation des ribosomes et la coagulation de leur ADN (**Fig. 67 E**), de même qu'un épaissement de la paroi cellulaire avec plusieurs altérations morphologiques, telles qu'un espace périplasmique accru avec une visualisation des extrémités cellulaires (**Fig. 67 F**). Par ailleurs, l'analyse MET des cellules d'*E. coli* traitées avec la solution de nanoparticules d'alginate +colistine a montré un allongement des cellules, un épaissement de la paroi cellulaire, une coagulation de l'ADN,

une condensation des ribosomes et même dans certains cas une rupture et une destruction de la membrane cytoplasmique (**Fig. 67 G-H**). Cependant, selon l'analyse MET, les cellules 184 traitées avec la colistine associée avec les nanoparticules d'alginate et l'acide lactique ont présenté des lésions cellulaires plus importantes que la colistine utilisée seule et la colistine associée avec les nanoparticules d'alginate. Les caractéristiques de ce traitement sont la destruction et la rupture de la membrane cytoplasmique et de la paroi cellulaire, la condensation des ribosomes et la coagulation de l'ADN, la présence de grands espaces électroluminescents, la perte de la granularité caractéristique et des cellules fantômes (**Fig. 67 I-J**). En outre, le traitement des cellules d'*E. coli* 184 avec la colistine associée avec le menthol et les nanoparticules d'alginate a montré par analyse MET une rupture et des irrégularités dans la paroi cellulaire, une destruction de la membrane cytoplasmique avec perte de matériel cytoplasmique, une coagulation de l'ADN, une condensation de ribosomes et une rétraction cytoplasmique ainsi qu'une présence de particules très lâches et de filaments fins (**Fig. 66 K-L**).

Cependant selon l'analyse MET, les cellules d'*E. coli* 184 traitées avec la colistine associée avec des nanoparticules d'alginate, la colistine associée avec des nanoparticules d'alginate et du menthol et/ou l'acide lactique ont présenté des lésions cellulaires plus importantes que lorsque la colistine était utilisée seule. Ce qui est en accord avec les résultats de dosage des protéines. D'après la littérature, l'activité antibactérienne des polymyxines contre les BGN a été expliquée par l'augmentation de la perméabilité de l'enveloppe cellulaire constituée de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique et par la fuite du contenu cellulaire (520). Selon Koike et al. (1969), le traitement d'*E. coli* par la polymyxine provoque l'apparition des projections et des empilements à la surface de la couche externe de la paroi cellulaire. Il a été démontré que la polymyxine agissait également sur la membrane cytoplasmique en la désorganisant (521). En outre, la colistine provoque une perturbation de la distribution du matériel biologique et l'agrégation du matériel chromatinien (516, 522). D'après Kaye et al. 1963(522), une souche d'*E. coli* non traitée à la polymyxine a la paroi cellulaire clairement visible, la membrane plasmique peut généralement être distinguée et est de faible densité électronique ; le cytoplasme granulaire est composé principalement de particules de ribonucléoprotéine et est clairement visible. En outre, l'apparition des profils d'éléments membraneux hélicoïdaux indique l'attachement des matériels cytoplasmiques à la membrane causé par l'irrégularité de la frontière entre le matériel nucléaire et le cytoplasme (523).

II-8) Stabilité des NPs alginate+colistine à différents pHs

Les données issues de cette expérience permettent d'évaluer la stabilité des nanoparticules d'alginate+colistine à différents pH et durant plusieurs temps d'incubation. L'étude de l'effet de pH sur la stabilité des nanoparticules est un atout indispensable pour prédire le comportement des nanoparticules dans l'appareil digestif des porcelets (ayant un pH acide) et dans la circulation sanguine (pH~7.4). Le deuxième paramètre à tester est l'influence du temps d'incubation sur l'intégrité des nanoparticules d'alginate+colistine.

La première étape de cette expérience est la préparation des nanoparticules alginate+colistine telle que décrite dans la section V-4-8 de la partie expérimentale. La concentration de la colistine utilisée est de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, et celle des nanoparticules est de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La stabilité des nanoparticules alginate+colistine a été évaluée par la détermination de la valeur de la CMI de chaque solution après incubation à différents pH pour différents temps.

La stabilité de la formulation « nanoparticules alginate+colistine » et par conséquent la détermination de son activité antibactérienne se traduit par la mesure de la CMI. Les nanoparticules qualifiées « stables » assurent une complexation efficace de la colistine contrôlant son activité antibactérienne. Les différentes mesures de la CMI sont représentées dans le **tableau 25**. La préparation des différentes solutions a été effectuée à pH 7, pour les solutions des NPs Alg+colistine+menthol et NPs Alg+colistine+acide lactique, l'ajustement à pH 7 a été réalisé par ajout de NaOH (6 M). A pH 7 et durant une incubation de 60 minutes, la mesure de la CMI montre une stabilité de l'activité (pas d'évolution de la valeur de la CMI pour toutes les solutions. Par contre, lorsque le pH est ajusté à 2 par ajout d'HCl (1 M), et une incubation de 100 min, suivie d'une incubation à pH 5 pendant 45 min, une variation de la CMI a été observée pour toutes les solutions. La CMI de la solution colistine a doublé, passant de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De la même manière, la CMI de la solution NPs Alg + colistine + acide lactique a aussi doublé de $0,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. Par contre, les CMIs des deux solutions NPs Alg + colistine et NPs Alg + colistine + menthol ont augmenté de $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $0,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. Donc l'incubation successive des NPs Alg+colistine à pH 2 et à pH 5 a conduit à la diminution de l'activité antibactérienne de la colistine. A pH 6 et 7, les CMIs obtenues sont égales aux CMIs déterminées à pH 5 pour les différentes solutions. Donc, on peut conclure que le pH très acide

(pH 2) a un effet négatif sur l'activité de la colistine mais une fois cette dernière adsorbée sur les nanoparticules, cet effet a légèrement diminué.

Tableau 25 : Effets du pH sur l'activité antagoniste des NPs alginate+Colistine avec l'acide lactique ou le menthol sur *E. coli* 184(*mcr*⁻¹).

CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
pH	pH 7	pH 2	pH 5	pH 6	pH 7
Temps d'incubation (min)	(60)	(100)	(45)	(30)	(15)
Mélanges					
Colistine ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	8	N'est pas investigué car à pH 2 la souche <i>E. coli</i> ne pousse pas (pH très acide).	16	8	8
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,25		5	5	5
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Acide lactique ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,62		1.25	1.25	1.25
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Menthol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,31		2.5	2.5	2.5

Selon Milne et al. 1958.(524), le pH des liquides corporels peut influencer sur l'efficacité thérapeutique des agents antibactériens. En outre, selon l'étude de Burian et al. 2012 (525), l'acidification à pH 5 de l'urine infectée par *E. coli* altère l'activité de la colistine en augmentant la CMI et en stimulant la prolifération de la souche d'*E. coli* (525). A des pH inférieurs à 6, l'activité antimicrobienne des antibiotiques est réduite. D'autre part, et d'après les résultats obtenus précédemment dans la partie stabilité des nanoparticules à pH 7, et

d'après la littérature, la stabilité de l'alginate dépend fortement de la température, du pH et de la présence de contaminants chimiques. Les liaisons glycosuriques sont susceptibles de rompre lorsque l'alginate est utilisé en milieu acide ou basique. Pour un pH au-dessous de 3, un risque d'hydrolyse des chaînes glycosuriques est très probable. Donc, on peut conclure que l'augmentation de la CMI de la colistine à pH 5 et puis sa diminution à pH 6 est due à l'effet du pH qui diminue les charges positives de la colistine et qui probablement affecte la chaîne glycosidique des nanoparticules d'alginate.

II-9) Stabilité des NPs alginate+colistine après traitement enzymatique

Nous avons évoqué précédemment l'importance de maintenir une bonne stabilité colloïdale des nanoparticules lors des tests d'activité antimicrobienne. Cette considération est cependant très rarement prise en compte lors des tests décrits dans la littérature. Nous avons investigué l'effet des enzymes digestives sur l'activité des NPs Alg + colistine + acide lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou menthol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sur *E. coli* 184 pendant deux temps d'incubation à deux pH (3 et 6). Trois enzymes ont été utilisées : la pepsine (enzyme digestive de l'estomac active à pH 3), la trypsine et la chymotrypsine (enzymes synthétisées dans le pancréas et sécrétées dans l'intestin grêle et actives entre pH 6 et 8). Différentes conditions ont été établies afin qu'elles soient les plus proches possibles des conditions retrouvées dans le tractus digestif du porcelet selon Zhong et al. (526).

Le **tableau 26** regroupe les résultats de la CMI des différentes formulations suite aux différents traitements enzymatiques. Pour la solution colistine ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$), la CMI pour le contrôle sans enzymes et sans incubation, et la CMI pour le contrôle ayant subi une incubation à 39°C pendant 30 min à pH 3 puis 2 h à pH 6 est de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En outre la valeur de la CMI pour la solution de la colistine adsorbée sur les nanoparticules est restée à $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ce qui signifie que l'activité antibactérienne de la colistine n'est pas affectée et que son association avec les nanoparticules d'alginate lui confère une sorte de protection qui lui permet de conserver une partie de son activité à température physiologique du porcelet. Cependant, les valeurs de CMI pour les solutions de la colistine adsorbée sur les nanoparticules d'alginate associées au menthol ou à l'acide lactique sont augmentées de $0,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $0,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. Ce qui signifie que la colistine a perdu une partie de son activité une fois associée avec l'acide lactique et le menthol à pH acide, malgré que l'acide lactique et le menthol aient un effet potentialisateur de l'inhibition de la croissance bactérienne (cf. Combinaison de la colistine avec les nanoparticules

d'alginate et le menthol ou l'acide lactique). Concernant le traitement avec la pepsine, les valeurs de CMI des deux différentes formulations, (NPs Alg+colistine et NPs Alg+colistine+acide lactique) sont plus élevées que les CMI obtenues avec les deux contrôles. Celles-ci sont augmentées de 4 et 2 fois respectivement, ce qui indique que la pepsine, qui est une enzyme intervenant dans la digestion au niveau de l'estomac, dégrade en partie la chaîne peptidique et provoque une diminution de l'activité antibactérienne des différentes solutions testées. Au contraire, les CMI des trois solutions NPs Alg+ colistine, NPs Alg+colistine+menthol et NPs Alg+colistine+acide lactique restent constantes (respectivement 5 et 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) même après ajout des deux enzymes pancréatiques. Contrairement à l'activité de la solution colistine dont la CMI a augmenté d'un facteur 4 et passe de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tableau 26 : Effets des enzymes digestives sur l'activité de la colistine+NPs alginate +acide lactique ou menthol sur *E. coli* 184(mcr-1⁺).

CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
Traitement enzymatique	Contrôle sans traitement (pH 7 et T 25°C)	Contrôle sans enzymes mais incubé 30min à pH 3 puis 2h à pH6*	Traitement avec pepsine incubé 30min à pH 3 puis 2h à pH6 sans ajout de trypsine+chymotrypsin*	Traitement avec pepsine incubé 30 min à pH 3 puis 2h à pH 6 avec ajout de trypsine+chymotrypsin*
Mélanges				
Colistine (60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	8	8	8	32 \geq
NPs Alg (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,25	1,25	5	5
NPs Alg (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,625	1,25	2,5	2,5

+ Acide lactique (15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
NPs Alg (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Colistine (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + Menthol (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,31	1,25	1,25	2,5
*Incubation : 39°C à 140 rpm / Pepsine 15U/ml; Trypsine 40U/ μl ; Chymotrypsine 5U/ml				

Il existe peu de données publiées sur l'effet de l'infection intestinale bactérienne chez les porcs sur l'absorption intestinale de la colistine. Une étude, réalisée par Rhouma et al. en 2015 (527) concernant la stabilité gastrique et la biodisponibilité orale du sulfate de colistine chez les porcs exposés à l'*E. coli* O149, a démontré la dégradation rapide de la colistine sulfate suite à l'ajout de la pepsine. Cependant, l'activité antimicrobienne de la colistine sulfate et de ses produits de dégradation n'est pas accompagnée d'une perte mais plutôt d'une légère augmentation de l'activité antimicrobienne, mais cette augmentation était statistiquement non significative et aucune différence n'a été relevée pour les CMI (527). Donc la pepsine n'affecte pas l'activité de la colistine seule, ce qui est en accord avec nos résultats. La colistine est également résistante à la trypsine (pH 4, 4 à 7, 5), à la pancréatine (pH 4,4 à 7,5), à l'érépsine (pH 6,1 à 7, 8), mais est inactivée par la lipase (427). Par contre, il n'y a aucune information disponible dans la littérature concernant la dégradation possible de la colistine dans le tube digestif du porc au niveau de l'intestin par l'enzyme chymotrypsine. Selon Falagas et al. (528), le sulfate de colistine et le colistiméthate de sodium ne sont pas absorbés par le tractus gastro-intestinal lors d'une administration par voie orale. Les solutions de sels de colistine sont relativement stables à un pH de 2–6, mais deviennent instables à un pH > 6, ce qui signifie que lors du passage de la colistine dans le tractus gastro-intestinal, sa composition chimique et son activité antibactérienne ne sont pas influencées par l'environnement gastrique. Donc, les propriétés antibactériennes de la colistine peuvent être conservées lorsqu'elles sont combinées avec des oligo.G d'alginate (425, 529).

III) Développement des formulations antibiotiques à base des peptides antimicrobiennes (E20, DRS-B2 et HB2)

Au cours des dernières décennies, l'utilisation abusive des antibiotiques conventionnels a généré des taux élevés d'antibiorésistance. Cette situation a mis en évidence le besoin de développer de nouvelles molécules antibiotiques afin de traiter les maladies infectieuses. Parmi les molécules antibiotiques, les peptides antimicrobiens (PAMs) constituent une alternative prometteuse pouvant offrir des applications thérapeutiques nouvelles contre diverses bactéries pathogènes (530). Les PAMs peuvent être synthétisés par des micro-organismes, des plantes et des animaux (531, 532).

III-1) Développement des formulations antibiotiques à base de la fraction E20

Les bactéries lactiques (BL) sont parmi les plus importants producteurs des bactériocines (533, 534). Ces bactéries sont en outre connues pour leurs propriétés probiotiques et technologiques comme ferments dans l'industrie alimentaire (530, 535, 536). Chez les BL, les lactobacilles ont été par exemple étudiés pour leur rôle dans la prévention et le traitement des maladies gastro-intestinales (532). Par exemple la souche *Lactobacillus reuteri* MM53, isolée du lait maternel, est capable de survivre dans le tractus gastro-intestinal et inhiber l'activité des bactéries entériques (537).

Nous allons aborder les propriétés antibiotiques de nouvelles souches de BL produisant de nouvelles bactériocines ayant une activité contre les bacilles à Gram-négatif. Ces molécules pouvant faire l'objet d'une application dans les domaines médical et alimentaire, comme molécules antibiotiques ou agents de conservation des aliments. Les bactériocines dont il s'agit dans ce chapitre sont produites par *Lactobacillus paracasei* ICVB411, enregistrée sous le numéro CNCM I-5369 dans la collection de l'Institut Pasteur-Paris.

Les bactériocines produites par *Lb. paracasei* ICVB411 et semi-purifiées, appelé E20, ont montré une inhibition contre un panel de souches d'*E. coli* dont des souches résistantes à la colistine, dénotant ainsi une possible application comme molécule alternative à cet antibiotique. L'utilisation de bactériocines présente un intérêt certain liés à l'absence de cytotoxicité cellulaire, avec aucun effet observé sur les lignées cellulaires humaine (HT29) et porcine (IPEC-1), et une activité prouvée sur un panel de souches d'*E. coli*. Afin de potentialiser l'activité antibiotique de l'extrait E20, nous avons procédé à la fixation de la

fraction E20 sur les nanoparticules d'alginate permettant des formulations (E20+alginate), et parfois associant E20 et petites molécules comme les huiles essentielles, et les acides organiques, donnant des formulations à trois composés. Toutes les formulations générées ont été testées sur plusieurs souches d'*E. coli* y compris celles qui sont naturellement résistantes à la colistine.

III-1-1) Analyse en spectrométrie de masse MALDI-MS

L'extrait E20 est un extrait peptidique actif produit par *Lb. paracasei* ICVB411. Le surnageant brut obtenu après culture de cette bactérie sur milieu de Man Rogosa Sharpe (MRS) est fractionné puis filtré sur une cartouche C18 en phase inverse. Deux concentrations de solvant, acétonitrile 10 et à 20 ont été utilisées pour éliminer une partie des contaminants présents, puis pour récupérer la fraction active E20. L'analyse par spectrométrie de masse de l'extrait actif E20 (avant et après passage sur une membrane de dialyse 8 KDa) montre la présence de plusieurs peptides présentant un rapport m/z inférieur à 4000, surtout entre 1 811 et 2 985, avec un pic isolé à 3 832. La **figure 68** présente l'analyse en MALDI-Tof de l'extrait actif E20. Le contrôle montre qu'il y'a aucune différence apparente n'ayant pu être observée entre avant et après dialyse.

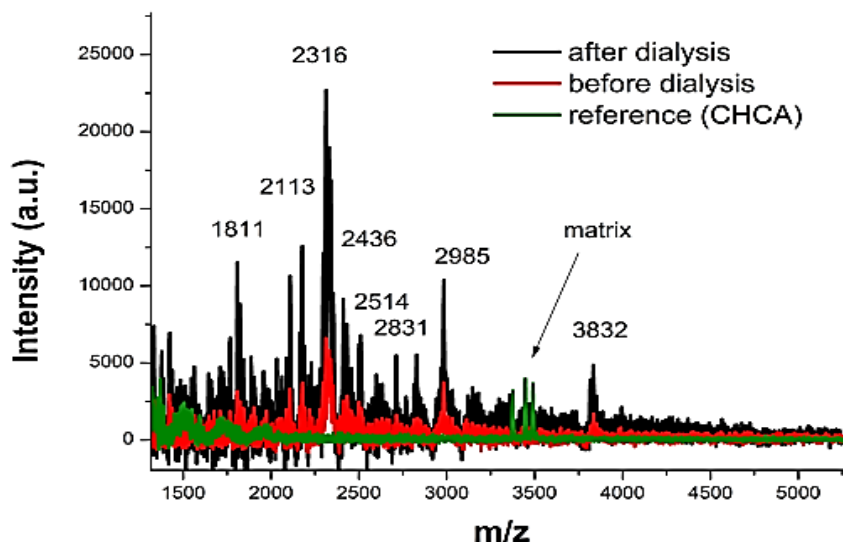


Figure 68 : Spectre MALDI-TOF-MS de l'extrait E20 avant et après dialyse (analyse réalisée par Mme Ioana Hosu) .

L'analyse de l'extrait E20 permet de mettre en évidence au moins, 5 à 8 peptides de tailles différentes, mais à ce stade l'identification de ces peptides n'a pu être réalisée. Cependant l'analyse bioinformatique de genome entier a permis d'identifier 5 genes codant pour des

bacteriocines. Ces bacteriocines font l'objet de recherche actuellement en cours afin de déterminer le rôle dont l'activité anti-G-Cette extrait est actif à pH 4,5 -5

III-1-2) Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)

Le chargement d'E20 ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sur des nanoparticules d'alginate (NPs Alg) n'a pas eu d'impact considérable sur leur taille, comme le montre le **tableau 27**. En effet, les mesures DDL ont révélé une taille moyenne de NPs Alg de 111.1 nm à pH 7, comparable à 119 nm enregistrée à pH 5. Une légère augmentation de la taille (5 nm) a été observée lors du chargement de la fraction E20 sur les NPs Alg, ce qui est une bonne indication sur l'adsorption peptidique à la surface des nanoparticules. Les résultats sont corroborés par des mesures de potentiel zêta. La surface des NP Alg est chargée négativement (-32 mV à pH 7) et (-12 mV à pH 5) et devient neutre à pH 5,4 lors de l'adsorption d'E20.

Tableau 27: Mesure de la taille et de la charge de surface des NPs alginate avant et après association avec E20 sur leur surface.

	Taille (nm)	Potentiel zêta(ζ) (mv)
NPs Alg (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), pH 7	111.1	-32
NPs Alg (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), pH 5	119.3	-12
NPs Alg +E20 (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), pH 5	113,7	-0,5
NPs Alg+E20, pH 5,4	124.0	0
NPs Alg (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	111.1	-14

III-1-3) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'E20

Les CMI de E20 ont été établies pour 10 souches différentes d'*E. coli*. Ces valeurs ont été déterminées par mesure de la croissance de la $\text{DO}_{620 \text{ nm}}$, après 18 heures de culture sur milieu BHI à 37°C. Ces CMI sont ensuite comparées à celles obtenues avec la colistine contre les mêmes cibles bactériennes.

➤ Concentration Minimale Inhibitrice de la Colistine et E20

* Les expériences décrites ci-dessous dans le tableau 28 ont été réalisées par le Dr Yanath Belguesmia.

Afin de déterminer les CMI des deux solutions peptidiques (colistine et fraction E20), il faut noter que l'activité antibactérienne de l'extrait E20 brut non dilué (16 mg.mL^{-1}) dépend du pH de la solution. D'après les résultats obtenus avec la méthode de diffusion en milieu gélosé à différents pH, E20 a une activité à pH 5, mais est inactif à pH 4, pH 6 et pH7 (résultats présentés ci-après, tableau 29). Les CMI d'E20 déterminées pour 10 souches d'*E. coli* sont présentées dans le **tableau 28**.

Tableau 28 : Concentration minimale inhibitrice de la colistine et de l'extrait E20 contre un panel de souches d'*E. coli*.

Souches	Colistine (CMI en $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	E20 (CMI en $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
ER 184	8	1000
ER 289	8	2000
E4A4 V	16	1000
E5A16 V	16	1000
ATTC8739	2	1000
CIP 7624	1	1000
SBS363	2	250
E4A4wt	2	1000
E5A16wt	2	1000
Top 10	1	1000

Les résultats obtenus (**Tableau 28**), indiquent que l'extrait E20 synthétisé par *Lb. paracasei* ICVB411 est bien actif contre des souches d'*E. coli* avec une CMI qui varie selon la souche cible testée. Les valeurs de CMI sont comprises entre $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre la souche *E. coli* SBS 363 (souche sensible à la colistine) et $2\ 000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ enregistrée pour *E. coli* 289 (souche résistante à la colistine). En dépit de ces CMI élevées, l'extrait E20 possède un potentiel antibactérien pouvant servir pour réduire la croissance d'*E. coli*. L'extrait E20 a été exploité dans la conception de nouvelles stratégies pour traiter les infections causées par ces BGN. Comme indiqué (**Figure 68**), l'extrait E20 est composé de plusieurs peptides dont les caractéristiques spectrales correspondent à celles des bactériocines.

III-1-4) Combinaison d'E20 avec des NPs alginate

Au regard des résultats obtenus par HPLC avec la colistine et au vu de l'annexe 3, la concentration de E20 associée avec des nanoparticules d'alginate NPs Alg (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) était 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ce qui correspond à un pourcentage de 12% de la concentration massique des nanoparticules d'alginate. Cette concentration correspond à la concentration maximale de la colistine adsorbée à la surface des NPs Alg. Nous avons fait plusieurs analyses par HPLC pour essayer de déterminer le pourcentage et la quantité d'E20 adsorbée sur les nanoparticules d'alginate, mais il n'a pas été possible de la déterminer car le chromatogramme de l'extrait E20 était trop large, avec plusieurs peptides élués simultanément dans un laps de temps très court, ceci malgré plusieurs tentatives d'ajustement des conditions d'élution (résultats présentés dans l'annexe 4). L'activité antibactérienne de la combinaison d'E20 (60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) avec les nanoparticules d'alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a été déterminée par la mesure de la CMI et du DI.

➤ Diamètre d'inhibition (DI) à différents pHs

Les diamètres d'inhibition obtenus pour les deux solutions E20 (12%= 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et NPs Alg + E20 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) en utilisant la souche *E. coli* 184, à différentes valeurs de pHs sont présentés dans le tableau 29. Les différentes solutions des NPs Alg+E20 ont été préparées dans un tampon acétate de pH5. La solution NPs Alg+E20 présente une activité anti-*E. coli* pendant les deux temps d'incubation à pH différents. A t0 min, la taille des halos d'inhibition est de 3-6 mm à pH 5 contre 1-3 mm pour les autres pH. Par contre, après 60 min d'incubation à pH 4, 6 et 7, la taille des halos d'inhibition a diminué de 1-3 mm à 0-1 mm alors qu'à pH 5, aucune variation de la taille du halo d'inhibition n'a été observée (3 à 6 mm). Ce qui signifie que l'activité de l'extrait peptidique E20 dépend du pH, cette activité est optimale à pH 5. Cependant, l'association de l'extrait E20 avec les NPs Alg a grandement potentialisé l'activité de l'extrait E20 brut. De plus, cette association a permis d'optimiser l'activité d'E20 pendant l'incubation à pH 5. Donc, on peut conclure que l'activité optimale de l'extrait peptidique E20 dépend du pH. En effet, l'extrait E20 est actif à pH 5 et sa combinaison avec les nanoparticules d'alginate lui permet de conserver cette activité à différentes valeurs de pHs. Cependant, le degré de cette activité diminue au cours du temps d'incubation, sauf à pH 5 en combinaison avec les NPs d'alginate ou celle-ci demeure optimale.

Tableau 29 : Diamètre d'inhibition de la combinaison E20 +NPs alginate à différents pH avec *E. coli* 184.

pH	NPs Alg+E20 (500:64) $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	0 min	60 min
pH 4	+	+/-
pH 5	++	++
pH6	+	+/-
pH 7	+	+/-

Correspondance avec la taille du halo d'inhibition : - : Pas d'inhibition ; +/- : 0-1mm ; + : 1-3mm ; ++ : 3 à 6mm ; +++ : >6mm

De nombreuses études sur les mécanismes antimicrobiens des bactériocines ont montré que l'interaction membranaire est une nécessité pour la quasi-totalité de ces mécanismes (538, 539). Ces études ont montré qu'il existait un certain nombre de facteurs majeurs dans les interactions membranaires des bactériocines, dont les plus importants étaient la charge, l'hydrophobie et l'amphiphilicité (540, 541). Le mécanisme d'action des bactériocines peut être dépendant du pH. Par exemple, la solubilité et la stabilité de la nisine augmentent considérablement avec l'acidité, elle est stable à pH 2 et peut être autoclavée à 121°C (542). Sous pH alcalin, la nisine a une perte d'activité croissante, avec une inactivation complète après 30 minutes à 63°C à pH 11 (543). Le pH est un facteur important des interactions membranaires et de l'activité biologique de certaines bactériocines (544). Par ailleurs, les bacteriocins cationiques fonctionnent mieux à pH acides qu'à pH neutre (545, 546). En outre, des bactériocines présentent une activité optimale selon le pH, auxquelles la protonation de ses résidus aura pour effet général d'augmenter la cationicité ou de diminuer l'anionicité en renforçant sa capacité à interagir avec les composants des membranes microbiennes chargées négativement (547).

➤ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice**

Au regard des résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu solide, qui montre une activité optimale d'E20 à pH 5, toutes les solutions utilisées ci-après sont préparées dans un tampon acétate ajusté à pH 5. L'évaluation de l'activité antibiotique de l'extrait E20 a été réalisée en utilisant une série de dilutions, en milieu liquide, qui permet d'établir les valeurs des CMI. Ainsi, les CMI enregistrées en utilisant la combinaison des NPs Alg+E20 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) avec les 8 souches d'*E. coli* sont représentées dans le tableau 30. Les

CMI de la solution NPs Alg + colistine obtenues varient de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ alors que celles de la solution NPs alginate+E20 sont de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. En ce qui concerne les souches *E. coli* 184 et *E. coli* 289, les CMI des deux solutions sont de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ce qui signifie que l'extrait E20 possède une activité antibactérienne similaire à l'activité de la colistine dans ces conditions. D'autre part, la CMI établies avec la solution NPs Alg+E20 en utilisant la souche *E. coli* E4A4v, comme souche cible, est deux fois moindre que la CMI de la solution NPs Alg+colistine, alors que la solution NPs Alg+E20 a une activité anti-E4A4v supérieure à l'activité de la solution NPs Alg+colistine. Les CMI de la solution NPs Alg+E20 vis-à-vis des souches sensibles à la colistine, sont de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, alors que la CMI de la colistine pure sur ces souches varie de 0,5 à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Malgré une activité anti-*E. coli* intrinsèque plus importante de la colistine comparativement à l'extrait E20 avec ces souches, on observe que la solution NPs Alg+E20 inhibe la croissance d'*E. coli* à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de E20 quelle que soit la souche considérée.

Tableau 30 : Valeurs des CMI des deux solutions (NPs alginate+ colistine et NPs alginate + E20) sur 10 souches d'*E. coli*.

Souches	NPs Alg+Colistine (CMI en $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	NPs Alg+ E20 (CMI en $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>E. coli</i> 184	4	4
<i>E. coli</i> 289	4	4
<i>E. coli</i> E4A4 V	4	2
<i>E. coli</i> ATTC8739	1	2
<i>E. coli</i> CIP 7624	1	2
<i>E. coli</i> SBS363	1	2
<i>E. coli</i> E4A4wt	2	2
<i>E. coli</i> Top 10	0,5	2

Concernant le comportement des différentes souches cibles vis-à-vis de l'extrait E20 associé avec les NPs Alg, on observe que les souches sont plus ou moins dans la même catégorie hormis les deux souches *E. coli* 184 et *E. coli* 289 qui présentent des CMI identiques à celles des solutions NPs alginate+colistine. Ces deux souches sont dans la catégorie des souches résistantes à la colistine ($\text{CMI} > 2\mu\text{g.mL}^{-1}$) (cf partie CMI de la colistine avec des NPs alginate). Comme nous l'avons souligné auparavant (combinaison de la colistine avec les nanoparticules d'alginate), l'utilisation d'oligosaccharides de faible poids moléculaire, notamment le biopolymère d'alginate capable d'impacter les bactéries multi-résistantes,

permettrait de rendre ces microorganismes plus sensibles à l'action des molécules antimicrobiennes et ainsi potentiellement de réduire leur résistance aux traitements antibiotiques (548). Nous avons constaté que l'association de l'extrait peptidique E20 avec les nanoparticules d'alginate offre une stratégie alternative à la colistine à prendre en considération, puisqu'elle présente un spectre d'activité contre la plupart des souches d'*E. coli* testées.

➤ Test de cytotoxicité sur des lignées cellulaires

La cytotoxicité de l'extrait E20 a été testée sur la lignée cellulaire Humaine (HT-29) et la lignée cellulaire porcine (IPEC-1). Les figures 67 et 68 présentent le pourcentage de survie cellulaire des deux lignées cellulaires en présence des différentes combinaisons associant E20 à pH 5 et 7. De manière générale, les différentes solutions à pH 5 et pH 7 ne sont pas toxiques pour les cellules porcines IPEC-1 (**figure 69**), le pourcentage de la mortalité cellulaire étant inférieur à 3% dans tous les cas. En outre avec l'extrait E20, le pourcentage de survie cellulaire est de 100% à pH 7 et de 107% à pH 5. En plus, la combinaison d'E20 avec les nanoparticules d'alginate n'a pas altéré les cellules, avec un pourcentage de survie évalué à 100%. Ce qui signifie que ce nouvel extrait peptidique n'est pas toxique pour les cellules porcines IPEC-1 à une concentration de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Sur les cellules HT-29, le tampon acétate (pH 5) altère la survie des cellules avec un pourcentage de mortalité de 20% alors qu'à pH 7, ce pourcentage est inférieur à 3% (**figure 70**). Ce qui indique, que le pH acide a un effet plus ou moins toxique sur les cellules HT-29. Par contre, les nanoparticules d'alginate d'une part et l'extrait E20 d'autre part, présentent une faible toxicité pour les cellules humaines HT-29 (pourcentage de mortalité <6%). Cependant, la combinaison de E20 et nanoparticules d'alginate a affecté la survie des cellules HT-29 en augmentant le pourcentage de mortalité de ces cellules, soumis à l'action des solutions à pH 7 et 5, de 2,2% et 5,7% à 18% et 21%, respectivement. Toutefois, cet effet n'est pas dû à l'action d'E20, mais est corrélé avec l'acidité du tampon (pH 5).

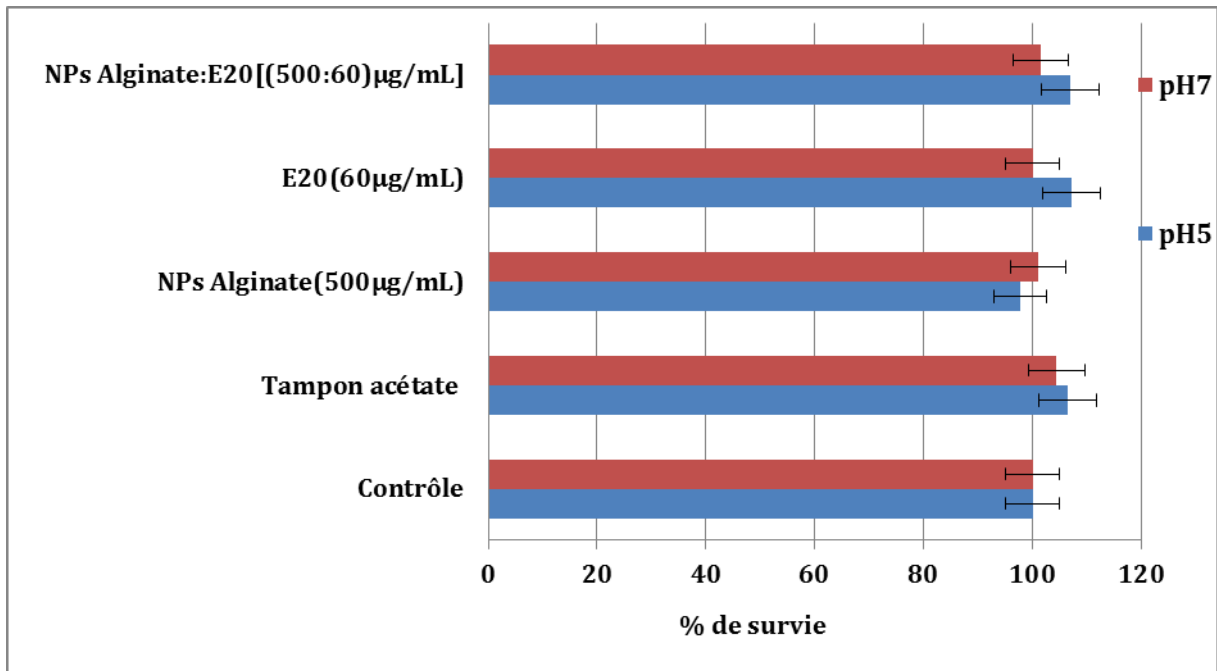


Figure 69 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1.

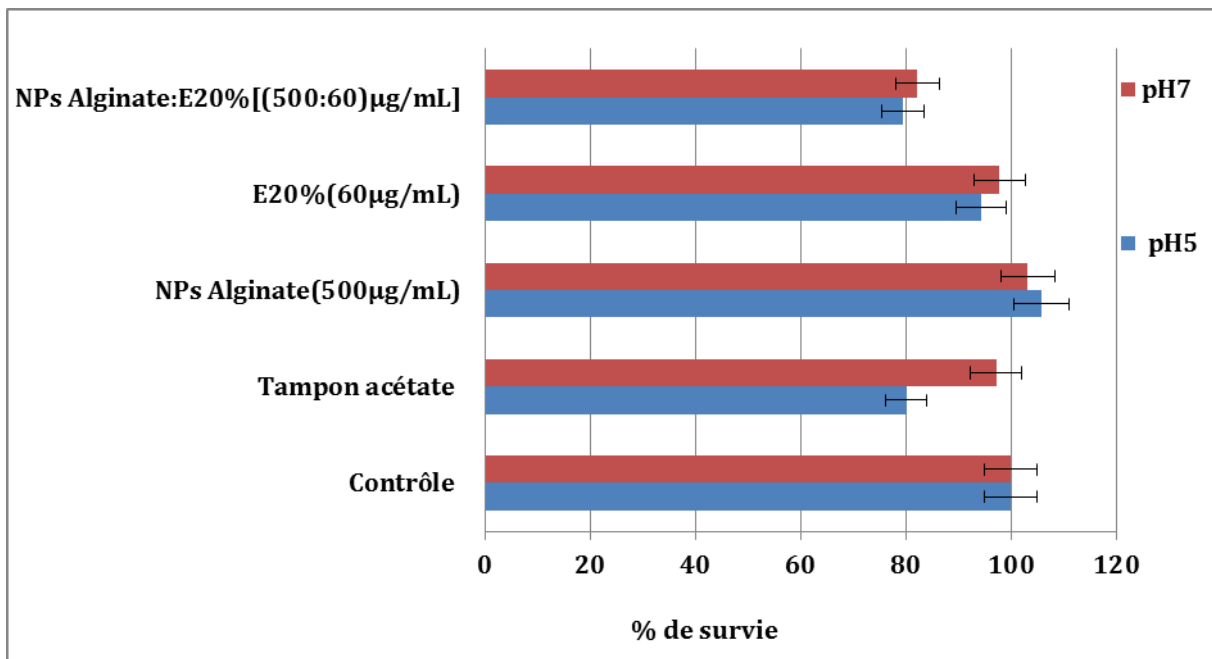


Figure 70 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire humaine HT-29.

Donc on peut conclure que l'extrait peptidique (E20) n'a aucune activité cytotoxique ni sur les cellules IPEC-1 ni sur les cellules HT-29, le faible pourcentage de mortalité est dû à l'effet du pH acide du tampon acétate.

III-1-5) Dosage des protéines

L'interaction des solutions de l'extrait peptidique E20 avec la bactérie *E. coli* 184 a engendré la fuite des contenus cytoplasmiques incluant les protéines (**figure 71**). La combinaison de l'extrait E20 avec les nanoparticules d'alginate a un effet considérable sur la fuite membranaire de protéines intracellulaires par rapport aux nanoparticules d'alginate (sans E20) et l'extrait E20 seul. La figure 70 illustre l'augmentation progressive de la perte des protéines en fonction du temps d'incubation avec les nanoparticules, E20 et E20 associé avec les nanoparticules d'alginate. Le choix de la concentration de chaque solution ayant été fait par rapport à la CMI déterminée auparavant. Ainsi la solution E20 présente une CMI de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ vis-à-vis d'*E. coli* 184. Cependant la concentration d'E20 avec les NPs alginate est de 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, donc nous avons également évalué l'effet de l'extrait E20 à cette concentration. La CMI de la solution des nanoparticules d'alginate+E20 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) étant de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

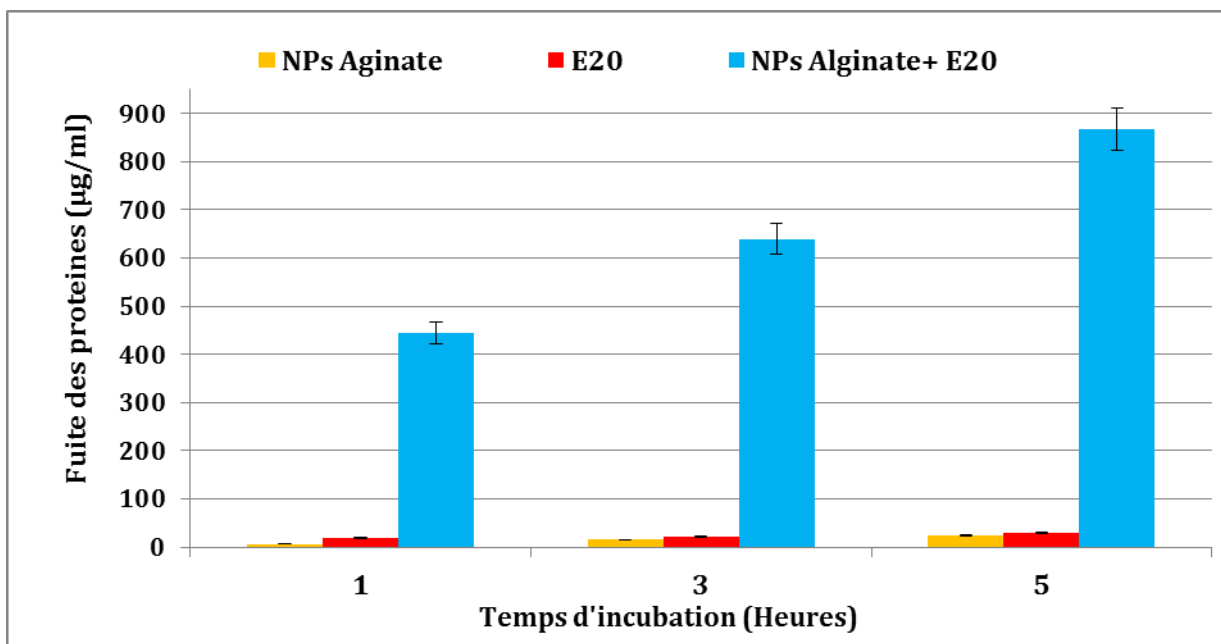


Figure 71 : Fuite de protéines de l'*E. coli* 184, [E20]=60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; [NPs alginate]=500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; solution [NPs alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) +E20 (4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)]= (CMI= 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

On observe une forte augmentation de la perte en protéines intracellulaires par rapport à celles observées suite aux traitements avec nanoparticules d'alginate (sans E20) et E20. De même, les NPs alginate+E20 ont également accéléré la fuite de protéines intracellulaires à travers la membrane d'*E. coli* 184. Initialement, la fuite de protéines dans les cellules de

l'expérimentation témoin (uniquement NPs alginate) s'élevait à $6,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ alors que la fuite de protéines après traitement avec E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et NPs alginate+ E20 ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) atteignaient $18,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $445,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement.

La fuite de protéines dans les cellules traitées avec E20 augmente jusqu'à $29,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ après 5 heures d'incubation, contre $886,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec la solution des NPs alginate + E20 après 5 heures d'incubation. La fuite de protéines lors de l'interaction avec la solution des NPs alginate+E20 est supérieure de $844,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à celle des nanoparticules (sans E20) et de $838,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à celle de l'extrait E20 seul. En terme de pourcentage, après 5 heures d'incubation, la suspension des NPs alginate + E20 augmente la fuite de protéine de 3529% comparativement avec les NPs alginate (sans E20) et de 2824% en comparaison avec E20 (sans NPs alginate).

Ainsi, la fuite des protéines intracellulaires était maximale lors du traitement avec la suspension NPs alginate + E20 par rapport aux NPs alginate et l'extrait E20. La solution de nanoparticules d'alginate + E20 entraîne plus de perte de protéines que la solution E20 sans nanoparticules, ce qui indique une bonne activité antibactérienne de l'extrait E20 combiné avec les nanoparticules d'alginate. Le mécanisme d'action exact de l'extrait peptidique E20 reste encore à élucider. Toutefois, il est possible que l'extrait E20 induise une lyse complète de l'organisme par rupture de la membrane ou qu'il perturbe la bicouche lipidique de la membrane, ce qui permet une fuite de certains composants cellulaires (549). Par ailleurs, les bactériocines ont la capacité d'interagir avec les lipides chargés négativement des membranes bactériennes, entraînant une déstabilisation et une perméabilisation de ces dernières et des contraintes multiples sur les protéines membranaires et une fuite du contenu cellulaire (550, 551). Cependant, les bactériocines peuvent former des pores dans la membrane permettant la fuite d'ions et d'autres matériaux de la cellule (552).

III-1-6) Imagerie par microscope électronique à transmission (MET)

La MET a été utilisée pour examiner les modifications ultrastructurales induites par les différentes solutions utilisées sur les bactéries après traitement. L'observation par MET des bactéries *E. coli* 184 traitées avec les deux solutions de nanoparticules d'alginate + E20 et extrait peptidique E20 seul, montre des changements structuraux sur la face extérieure et à l'intérieur de la bactérie qui sont absents chez les bactéries non traitées.

Les cellules *E. coli* 184 non traitées présentent une forme normale, avec une structure non endommagée de la membrane interne et une membrane externe intacte légèrement ondulée. L'espace périplasmique est mince et d'aspect uniforme (**Fig. 72-A-B**). Après incubation avec les nanoparticules d'alginate, les cellules présentent une densité accrue du cytosol, avec des membranes interne et externe intactes (**Fig. 72-C**). Après incubation avec E20 (à $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), nous avons observé la formation de structures membranaires supplémentaires, aucun dommage de la membrane interne et externe n'a été observé et les contenus cytoplasmiques sont rétractés avec un gonflement de l'espace périplasmique (**Fig. 72 D-E**). Alors qu'après incubation avec la solution de NPs Alg+E20 ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$: $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), de nombreuses modifications assez importantes ont été observées, avec des lésions cellulaires et rupture de la membrane. L'espace périplasmique était complètement rempli de matériau dense provenant du cytosol et la présence de filaments fins (**Fig. 72-F-G**). Dans tous les cas, les cellules *E. coli* après traitement avec l'extrait E20 associé avec les nanoparticules d'alginate ont présenté des dommages et des destructions des membranes cellulaires plus importantes que lorsque l'extrait E20 était utilisé seul.

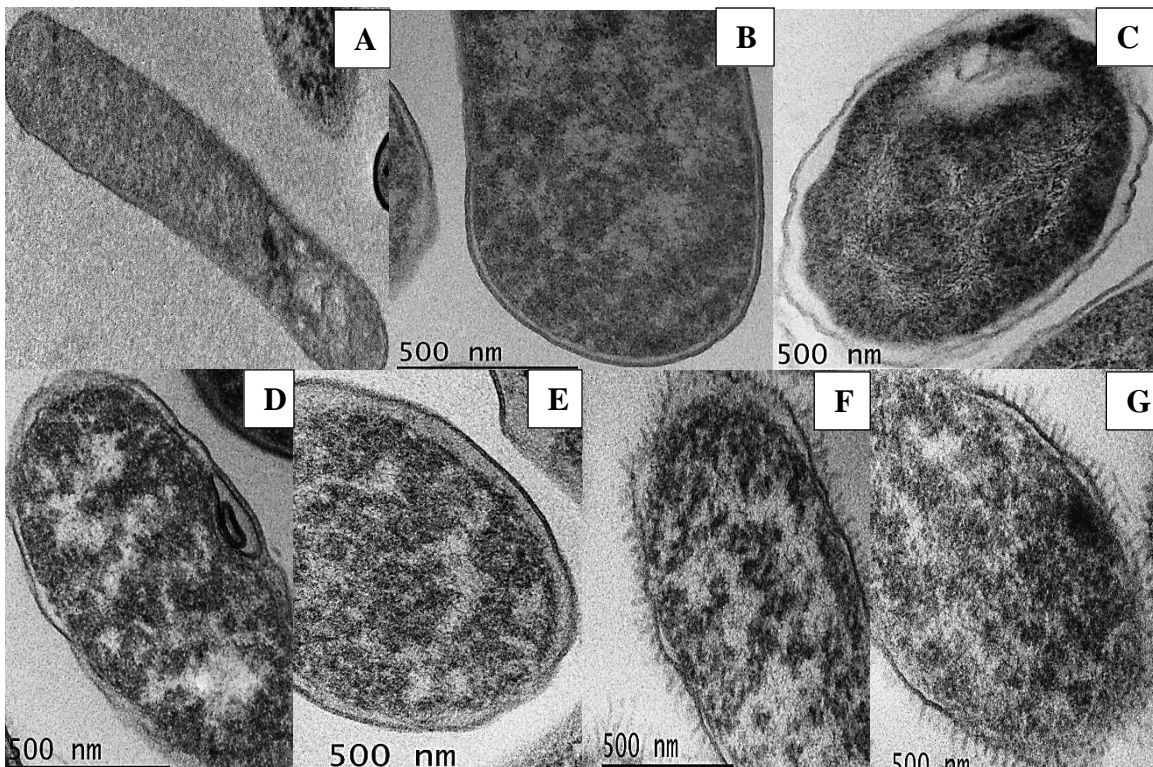


Figure 72 : Micrographie électronique à transmission (MET) de la souche *E. coli* 184 traitée avec différentes solutions antimicrobiennes ; A-B: Contrôle; C: NPs Alg ($500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); D-E : E20; F-G: NPs Alg+E20.

Comme l'extrait E20 est un mélange de plusieurs peptides, le mode d'action n'est pas encore exactement identifié.

Le mode d'action diffère d'une bactériocine à une autre, mais en général le mécanisme d'action se décompose en 3 étapes : la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible (les peptides sont électrostatiquement attirés par les couches superficielles bactériennes chargées négativement); l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique, en provoquant la déstabilisation et la perméabilisation de la membrane cellulaire, et enfin la fuite du contenu cellulaire vital (553). Dans tous les cas, la membrane bactérienne est gravement endommagée, ce qui peut entraîner la mort cellulaire. Cependant, l'observation des altérations de l'intégrité de la membrane bactérienne par MET peut aider à clarifier le mécanisme d'action des bactériocines (549).

III-1-7) Combinaison d'E20 avec des NPs alginate et des huiles essentielles

Les associations des bactériocines avec d'autres agents antimicrobiens peuvent élargir le spectre des antimicrobiens et / ou entraîner une réduction de la concentration des antibiotiques nécessaires à l'efficacité des traitements (448). Ce qui peut également réduire voire éliminer les effets secondaires potentiellement toxiques ou indésirables de ces molécules (554). Nous avons entrepris l'étude de la combinaison de l'extrait peptidique E20 avec d'autres agents antimicrobiens pour déterminer s'il y a un effet potentialisateur de son activité anti-*E. coli*. L'extrait peptidique E20 a été associé avec des nanoparticules d'alginate et 3 huiles essentielles (menthol, thymol ou α -pinène). La concentration d'E20 utilisée est de 10% = 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ce pourcentage en E20 est par rapport à la concentration massique des NPs Alginate 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et la concentration en huile essentielle est de 2% = 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentration non cytotoxique).

➤ Tests d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des différentes combinaisons d'E20 (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + NPs d'alginate (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + huile essentielle (Menthol, thymol ou α -pinène) sur 10 souches d'*E. coli* a été déterminée par le calcul de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'E20. On notera que la méthode de diffusion en milieu solide, qui détermine les diamètres des halos d'inhibition, a été faite au préalable (résultats non présentés). Le **tableau 31** présente les CMI d'E20 dans les différentes solutions. De façon générale, les CMI des solutions d'extrait peptidique E20 associé avec les nanoparticules d'alginate et les différentes huiles essentielles

sont inférieures à la CMI de la solution E20 avec les nanoparticules d'alginate (sans huile essentielle).

Par rapport à l'activité antibactérienne de la solution NPs alginate+E20+menthol, la CMI de cette solution avec les 5 souches sensibles à la colistine est quatre fois moindre que la CMI de la solution NPs Alg+E20 sans menthol, diminuant de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La CMI vis-à-vis de la souche 184 (*mcr-I*⁺) diminue également de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ avec la solution NPs Alg +E20+menthol. L'ajout du menthol a permis donc de réduire la CMI de 4 fois. Par contre, les CMI avec la souche ER 289 et E4A16v sont restées à 4 et 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement, aucune potentialisation de l'action inhibitrice n'a été relevée pour ces deux souches. Les souches d'*E. coli* ayant une CMI de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont en nombre de 5, celles ayant une CMI de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont 2. Les 2 souches restantes testées ont une CMI de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tableau 31 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait E 20 combiné avec les huiles essentielles et des NPs alginate

Souches	NPs Alg +E20 (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])	NPs Alg+E20 +Menthol (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])	NPs Alg+E20+Thymol (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])	NPs Alg+E20 + α - pinène (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])
ER 184	4	1	1	2
ER 289	4	4	1	2
E4A4 V	2	2	2	4
E5A16 V	2	2	0,5	2
ATTC8739	2	0,5	0,5	0,5
CIP 7624	2	0,5	0,5	0,5
SBS363	2	0,5	0,5	1
E4A4wt	2	1	0,5	2
E5A16wt	2	1	0,5	1
Top 10	2	0,5	0,5	0,5

Concernant les CMI de la solution NPs Alg+E20 +Thymol sont $\leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les 10 souches d'*E. coli* testées. La CMI avec la souche *E. coli* E4A4v étant de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tandis que les CMI pour les autres souches sont de 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sauf pour *E. coli* ER184 et *E. coli* 289, pour lesquelles la CMI est de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. En comparant l'activité antibactérienne du menthol et du thymol combiné avec la solution de nanoparticules d'alginate + E20, le thymol a une

activité anti-*E. coli* (555) légèrement supérieure à l'activité inhibitrice du menthol (556). La CMI la plus élevée en présence du thymol est de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contre $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec le menthol. En outre la sensibilité des souches avec le thymol a augmenté ($\text{CMI} \leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (557, 558). Ensuite, en ce qui concerne l'activité antibactérienne de la solution E20 en présence de l' α -pinène, les CMI de l'extrait peptidique E20 avec les différentes souches (hormis la souche *E. coli* E4A4v pour laquelle la CMI est $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sont respectivement de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour *E. coli* ATCC8739, *E. coli* E5A5wt et *E. coli* 184.

En se basant sur le profil des CMIs des 3 solutions d'E20 obtenues avec les différentes souches testées, on observe que la solution NPs alginate+ E20 +thymol possède le pouvoir inhibiteur le plus important avec un nombre supérieur de souches pour lesquelles la CMI est de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. On retrouve ensuite le menthol et enfin l' α -pinène. D'autre part, l'association entre E20 et les nanoparticules d'alginate et les huiles essentielles permet de réduire la CMI de l'extrait E20 de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ceci traduit un effet de synergie de cette huile essentielle sur l'extrait E 20 adsorbé sur les nanoparticules d'alginate.

L'effet de diverses combinaisons de substances antimicrobiennes avec des huiles essentielles a fait l'objet de nombreuses recherches (559, 560). Lebel et al. 2019 (561) ont étudié les activités antibactériennes des huiles essentielles sur les agents pathogènes respiratoires du porc, et leurs interactions synergiques avec une bactériocine (la nisine) afin de montrer qu'il existait de fortes interactions synergiques entre la nisine et les huiles essentielles de thym et de sarriette (561).

D'autres études ont montré que deux bactériocines (la nisine et la pédiocine) agissaient en synergie avec les huiles essentielles pour éliminer les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries responsables de l'altération des aliments (562). Ainsi, par exemple, la combinaison de la nisine avec le carvacrol ou avec le thymol produisait un effet synergique contre *E. coli* O157: H7 (563). D'autre part, l'étude de Field et al. (2015) a démontré que des préparations semi-purifiées de nisine A et de nisine V, et leurs combinaisons avec le carvacrol et le thymol, ont pour effet d'inhiber la prolifération de *Listeria monocytogenes* dans un modèle de système alimentaire. Il a été démontré qu'une phase de latence très retardée survenait pendant la croissance lorsque la nisine V était combinée avec du thymol (0,2%) et du carvacrol (0,2%) (564). Field et al. (2017) ont démontré que l'association de la nisine avec diverses huiles essentielles, tel que le trans-cinnamaldéhyde, pouvait élargir l'éventail des traitements utiles et constituer une nouvelle stratégie d'inhibition de la croissance d'*E. coli*

chez les porcs en post-sevrage (565). D'après Ettayebi et al. (2000), l'activité antimicrobienne de la nisine est potentialisée lorsqu'elle était associée au thymol, à des concentrations sub-inhibitrices vis-à-vis de la souche cible *L. monocytogenes* ATCC7644 (484). L'association des bactériocines avec des agents antimicrobiens permet de réduire le risque de prolifération de certains agents pathogènes émergents (486).

➤ **Test de cytotoxicité**

Au regard des résultats obtenus avec les associations extrait peptidique E20, nanoparticules d'alginate et huiles essentielles, une évaluation de la cytotoxicité de ces combinaisons a été effectuée sur les deux lignées cellulaires animale IPEC-1 et humaine HT-29. Toutes les solutions ont été préparées dans un tampon acétate de pH 5.

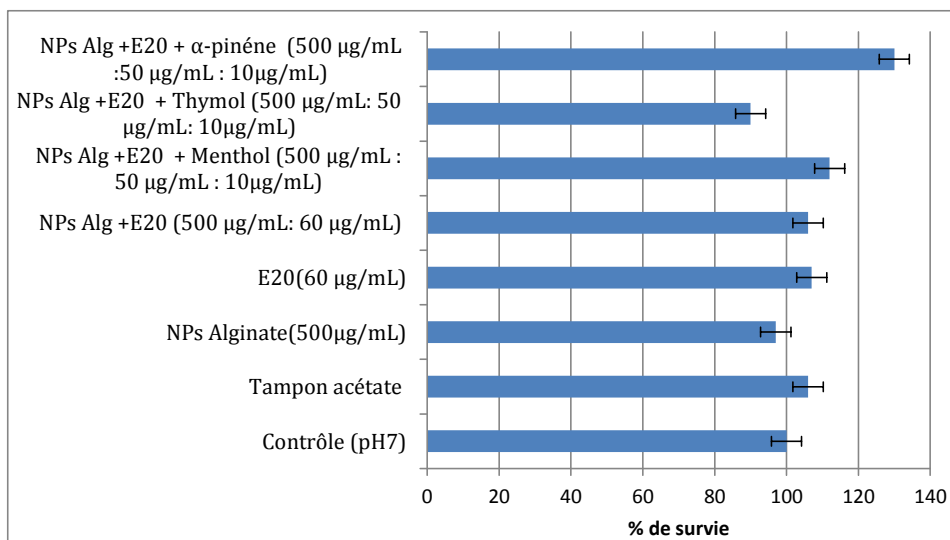


Figure 73 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire IPEC-1.

Il apparaît que le pourcentage de cytotoxicité des différentes solutions ne dépasse pas 10%. Les différentes combinaisons ne sont donc pas toxiques pour les cellules porcines IPEC-1 (**Figure 73**).

D'après les résultats de la **figure 74**, les différentes combinaisons des huiles essentielles avec E20 et les NPs Alg ne présentent aucun effet d'altération cellulaire, le pourcentage de survie est supérieur à 100%.

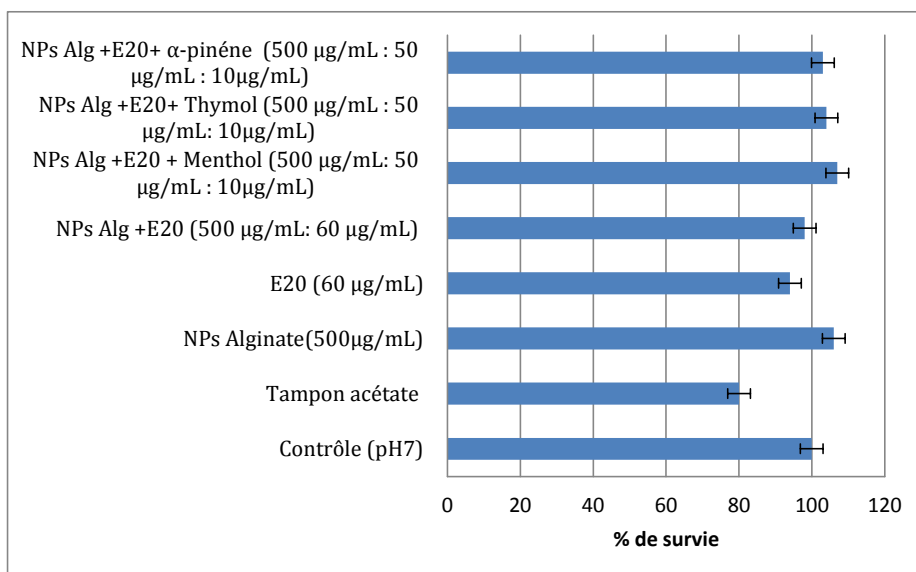


Figure 74 : Cytotoxicité des différentes solutions d'E20 sur la lignée cellulaire humaine HT-29.

Donc on peut conclure que l'association de l'extrait E20 avec les NPs Alg et les huiles essentielles 2% ne sont pas toxiques pour les deux lignées cellulaires utilisées, à savoir la lignée IPEC-1 et la lignée humaine HT-29.

III-1-8) Combinaison de E20 avec des NPs alginate et des acides organiques

➤ Tests d'activité antibactérienne

Nous avons testé 5 acides organiques différents (acide lactique, citrique, sorbique, formique et propionique), mais seule la combinaison de deux acides (acide lactique ou acide citrique) avec NPs Alg et E20 a donné des résultats probants. L'activité antibactérienne de la solution NPs alginate + E20 +acide lactique testée sur les 10 souches d'*E. coli* sélectionnées a été déterminée par la mesure la CMI de l'extrait E20. Les pourcentages utilisés en acide lactique, acide citrique et E20 étaient de 0,2%, 0,2% et 12%, respectivement, par rapport à la concentration massique des nanoparticules d'alginate. Ce qui correspond à des concentrations de 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ en acides et 60 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ en E20. La solution NPs Alg+colistine a une concentration en colistine de 60 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ et la solution NPs Alg+E20 a une concentration en E20 de 60 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Le **tableau 32** présente la CMI d'E20 dans les solutions de nanoparticules alginate+E20+acide lactique/acide citrique.

Tableau 32 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait E20 combiné avec des NPs alginate + acide (lactique / citrique)

Souches	NPs Alg + Colistine (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])	NPs Alg+E20 (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])	NPs Alg+E20+ A. lactique (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])	NPs Alg+E20+ A. citrique (CMI [$\mu\text{g.mL}^{-1}$])
<i>E. coli</i> 184	4	4	2	4
<i>E. coli</i> 289	4	4	2	2
<i>E. coli</i> E4A4 V	4	4	2	2
<i>E. coli</i> E5A16 V	4	2	2	2
<i>E. coli</i> ATCC8739	1	2	0,5	1
<i>E. coli</i> CIP 7624	1	2	2	2
<i>E. coli</i> SBS363	1	2	1	2
<i>E. coli</i> E4A4wt	2	2	2	2
<i>E. coli</i> E5A16wt	2	2	2	2
<i>E. coli</i> Top 10	0,5	2	0,5	1

La combinaison de l'extrait E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) avec des nanoparticules d'alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et l'acide lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a diminué les CMI d'E20 de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les souches *E. coli* 184, *E. coli* 289 et *E. coli* E4A4 v, et de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les souches *E. coli* ATCC8739 et *E. coli* Top 10. La CMI de la fraction E20 pour *E. coli* SBS 363 a également diminué de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En outre, la combinaison avec l'acide citrique, a permis aussi de réduire la CMI d'E20 de moitié pour les souches 289, E4A4v et ATCC 8739 et Top10.

Selon l'étude de Smith et al. 2016, le dérivé de nisine M21A ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), modifié par génie génétique, inhibait plus efficacement les biofilms de F6854 de *L. monocytogenes* que la nisine de type sauvage, lorsqu'il était associé à de l'acide citrique ($175 \mu\text{g/mL}$) ou du cinnamaldéhyde ($35 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (566). Selon l'étude de Lin et al. (2013), l'activité antimicrobienne des acides organiques (acide acétique, acide citrique, et acide lactique) sur la bactérie *Shigella spp*, était variable. Cependant, l'acide lactique était l'agent antimicrobien le plus efficace contre les espèces de *Shigella* testées (567). En outre, Long et al. en 2018 (568) ont montré que l'association des acides organiques peut être utilisée pour remplacer l'utilisation des antibiotiques sur la base des effets positifs sur les performances, l'immunité sérique, la morphologie intestinale et le microbiote chez les porcelets sevrés (568). D'après Kang et al. 2014 (569), la combinaison de la nisine avec des sels des acides organiques s'est

révélée être une option de traitement efficace pour réduire et minimiser la croissance ultérieure de *L. monocytogenes* durant le temps de conservation du saumon fumé à froid (569).

L'association des acides organiques avec différentes bactériocines a été rapportée comme des agents de conservation et d'inhibition des agents pathogènes au cours de stockage des aliments (503). D'après Zhao et al. (2017), la combinaison de la nisine avec l'acide citrique pourrait être utilisée comme un nouvel agent de conservation des aliments et également comme agent antibactérien pouvant limiter la croissance de *S. aureus* et *L. monocytogenes* afin de réduire le problème de la résistance bactérienne de ces deux agents pathogènes (570).

➤ Test de cytotoxicité

Le pourcentage de survie cellulaire avec la solution NPs Alg+E20+acide lactique (0.2%) est respectivement de 84 % et 92% pour les deux lignées cellulaires HT-29 et IPEC-1 (Figure 75). Le pourcentage de survie avec la solution NPs Alg+ E20+acide citrique est légèrement supérieure avec 97% et 106% pour HT-29 et IPEC-1 respectivement. Il faut, cependant, noter que l'acide lactique est toxique pour les deux lignées cellulaires à une concentration supérieure à 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (cf. partie résultats, combinaison de la colistine avec l'acide lactique). Donc on peut conclure que les différentes combinaisons avec le nouvel extrait peptidique E20 ne sont pas toxiques sur les lignées cellulaires testées (IPEC-1 et HT-29).

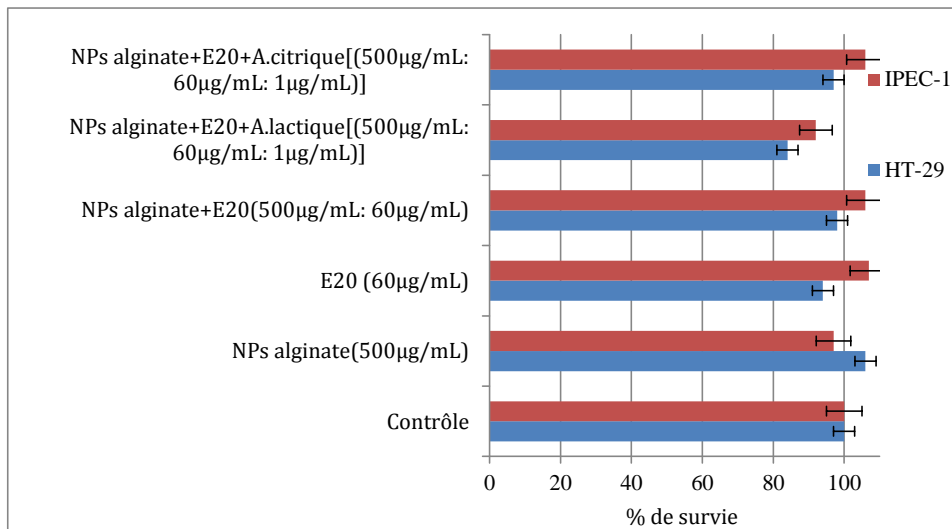


Figure 75 : Cytotoxicité de l'extrait E20 associé avec l'acide lactique et l'acide citrique sur les lignées cellulaires IPEC-1 et HT-29.

III-1-9) Combinaison d'E20 avec des NPs alginate et la colistine

L'association d'agents antimicrobiens peut permettre l'augmentation de leur efficacité et la réduction de l'évolution de la résistance aux différents agents thérapeutiques. Ainsi, l'utilisation de la thérapie antimicrobienne combinée est largement utilisée dans le traitement des infections graves (571). Différentes études antérieures ont démontré une potentialisation de l'activité antibactérienne des antibiotiques en combinaison avec des bactériocines, généralement sans effet toxique notable (572). La combinaison de la polymyxine B et de la nisine a montré une activité synergique d'inhibition contre *L. innocua* (BGP) et *E. coli* (BGN) (573). L'association de ces deux agents antibactériens à de faibles concentrations a permis d'inhiber la croissance de bactéries résistantes à la polymyxine B et la nisine A (573). Par ailleurs, Chi et al. (2018) ont également observé une action synergique de la garvicine KS et de la polymyxine B contre *A. baumannii*. En outre, l'association de la polymyxine B avec la nisine et la garvicine KS a entraîné l'éradication d'*E. coli* LMGT 3704 après 8 heures d'exposition (500). Afin d'évaluer l'effet synergique des différentes combinaisons associant l'extrait E20 et la colistine, leurs activités antibactériennes ont été étudiées et déterminées par les tests de diffusion en milieu solide et d'inhibition en milieu liquide sur la souche *E.coli*184.

➤ **Diamètres d'inhibition anti-*E. coli* 184**

La combinaison de la colistine et E20 a été réalisée à différents pourcentages massiques par rapport à la concentration massique des nanoparticules d'alginate, qui est fixe (500 µg.mL⁻¹). Les pourcentages 4%, 6%, 8% et 12% correspondant aux concentrations 20 µg.mL⁻¹, 30 µg.mL⁻¹, 40 µg.mL⁻¹ et 60 µg.mL⁻¹, respectivement. Les solutions ont été préparées dans un tampon acétate (pH 5). L'activité antibactérienne des différentes combinaisons a été déterminée suite à une incubation de 60 min, afin de déterminer les diamètres des halos d'inhibition à pH 5 (**tableau 33**). Les concentrations de l'extrait E20 (12%) et la colistine (12%) sont largement inférieures aux CMI et donc n'ont pas d'effet inhibiteur sur la croissance d'*E. coli* 184. La combinaison de la colistine avec l'extrait E20 à différentes pourcentages (4%, 6% et 8%) révèle des halos d'inhibition de 3 à 6 mm après 60 minutes d'incubation. Ce qui signifie que l'association de ces deux agents antibactériens permet de potentialiser leur activité inhibitrice sur la croissance d'*E. coli* 184. L'association du mélange E20 (8%) +colistine (4%) et E20 (4%) +colistine (8%) avec des nanoparticules d'alginate (500 µg.mL⁻¹) produit des zones d'inhibition avec des diamètres de 3-6 mm. L'association des NPs Alg avec E20 (6%) et colistine (6%) permet également d'augmenter les diamètres des zones d'inhibition de 3-6 mm à > 6 mm. La combinaison de la colistine avec E20, à 6%, avec les NPs Alg présente l'activité inhibitrice la plus importante. L'association de cette combinaison avec les NPs Alg permet de potentialiser l'action antibactérienne des deux molécules.

Tableau 33 : Diamètre d'inhibition anti-ER184 des combinaisons E20+colistine.

Solution	<i>E. coli</i> 184
Colistine 12%	-
E20 (12%)	-
E20 (8%) +colistine (4%)	++
E20 (6%) +colistine (6%)	++
E20 (4%) +colistine (8%)	++
NPs Alg+E20 (8%) +colistine (4%)	++
NPs Alg+E20 (6%) +colistine (6%)	+++
NPs Alg+E20 (4%) +colistine (8%)	++

Correspondance avec la taille du halo d'inhibition : - : Pas d'inhibition ; +/- : 0-1mm ; + : 1-3mm ; ++ : 3 à 6mm ; +++ : >6mm.

➤ **CMI de la fraction E20 associée avec des NPs alginate et la colistine vis-à-vis d'*E. coli* 184**

Au vu des résultats obtenus avec la méthode de diffusion en milieu solide, la solution NPs Alg + E20 (6%) + colistine (6%) a été retenue afin de déterminer la CMI (en milieu liquide) de la colistine et E20 sur *E. coli* 184 dans deux conditions de pH (5 et 7). Le pourcentage 6% correspond à une concentration massique de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La solution E20 (60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a une CMI non déterminée (résultat présenté précédemment). Les CMI des deux solutions colistine (12%) et NPs Alg + colistine (12%) augmentent de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement pour les pH 7 et 5. A contraire, la CMI de la solution NPs Alg + E20 a diminué de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les pH 7 et 5. Comme il a été démontré précédemment, l'activité optimale du peptide E20 est obtenue à pH 5, pH auquel la combinaison avec les NPs alginate potentialise cette activité (**Tableau 34**).

Tableau 34 : CMI de la combinaison E20 + colistine vis-à-vis d'*E. coli* 184.

Solution	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) à pH5		CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) à pH7	
	Colistine	E20	Colistine	E20
Colistine 12%	16	-	8	-
E20 (12%)		ND		ND
NPs Alg + Colistine (12%)	8	-	4	-
NPs Alg+ E20 (12%)	-	4	-	32
E20 (6%)+Colistine (6%)	8	8	4	4
NPs Alg+E20 (6%) +Colistine (6%)	4	4	2	2

Concernant la combinaison E20 (6%) et colistine (6%), les CMI de la colistine et E20 sont de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à pH 5 et 7, respectivement. En comparant les CMI de la colistine (12%) sans la fraction E20 et colistine (6%) avec E20 à pH 5 et pH 7, il apparaît qu'à pH 5 la CMI de la colistine (12%) était de 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tandis que la CMI de la colistine combinée avec E20 est réduite de moitié (8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Toutefois à pH 7, la CMI de la colistine diminue de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ quand elle est associée avec E20. L'association de la fraction E20 avec la colistine inhibe la croissance d'*E. coli* 184 à une concentration de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement à pH 5 et 7. Cette différence entre les CMI de la fraction E20 est due à la variation du pH (E20 ayant une activité optimale à pH 5).

L'association NPs Alg + E20 (6%) + colistine (6%) permet de réduire les CMI de la colistine et de l'extrait E20 de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Si on compare les CMI de la colistine et d'E20 relevées pour les différentes associations, on remarque que la combinaison de ces deux agents antimicrobiens avec les nanoparticules de nature polysaccharidique augmente leur pouvoir d'inhibition sur la croissance d'*E. coli* 184 résistante à la colistine de façon pH dépendante.

Un certain nombre d'études a été mené sur l'association des bactériocines à d'autres agents antimicrobiens, afin d'augmenter leur pouvoir inhibiteur et/ou diminuer le risque de développement des résistances (448). De telles combinaisons bactériocine-antimicrobien pourraient limiter le risque de développement des résistances en raison de l'implication de deux mécanismes d'action antimicrobiens distincts (574). Les combinaisons des bactériocines et antibiotiques peuvent également diminuer la concentration d'antibiotique nécessaire pour éliminer un agent pathogène cible, diminuant ainsi le risque d'effets secondaires indésirables associés à l'antibiotique (575). Un exemple de ces effets indésirables étant celui de la néphrotoxicité associée au groupe d'antibiotiques polymyxines (575). En outre, l'option des combinaisons synergiques des bactériocines avec des antibiotiques peut élargir le spectre d'activité, ce qui peut être utile dans le traitement des infections bactériennes (574).

Indépendamment de la souche et de l'antibiotique étudiés, des valeurs de pH inférieures à 6 entraînent une réduction de l'activité antimicrobienne de l'antibiotique (525). L'acidification de l'urine infectée par *E. coli* à pH 5 altère l'activité antimicrobienne de la colistine en augmentant la CMI et en stimulant la prolifération de la souche (525). Selon l'étude réalisée par Al Atya et al. en 2016 (576), l'association de la colistine avec la nisine et l'entérocin DD14 permet d'éradiquer les cultures planctoniques et les biofilms d'*E. coli* CIP54127, ainsi que d'autres souches d'*E. coli* présentant un phénotype de résistance à la colistine, comme 184 (*mcr-I*⁺) et 289 (*mcr-I*⁻). Ces résultats suggèrent que des bactériocines, produites par des bactéries lactiques, pourraient être utilisées en tant qu'agents capables d'augmenter l'efficacité thérapeutique des antibiotiques (576). Les avantages potentiels d'une association à des nouvelles bactériocines telle que l'extrait E20, qui pourraient agir en synergie avec la colistine sont évidents. En conclusion, la concentration de colistine nécessaire pour éradiquer la bactérie 184 était significativement réduite lorsqu'elle est associée avec l'extrait E20.

➤ Test de cytotoxicité

La toxicité de la combinaison de la colistine (6%) avec E20 (6%) a été réalisée sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1 à pH 5 et 7. La **figure 76** présente les pourcentages de survie

cellulaire en présence des différentes combinaisons. Dans les conditions expérimentales utilisées, nous avons observé que la combinaison de l'extrait E20 avec la colistine ne possède pas d'effet toxique sur les cellules IPEC-1. Le pourcentage de survie cellulaire des cellules IPEC-1 est de 100% à pH 5 et 7.

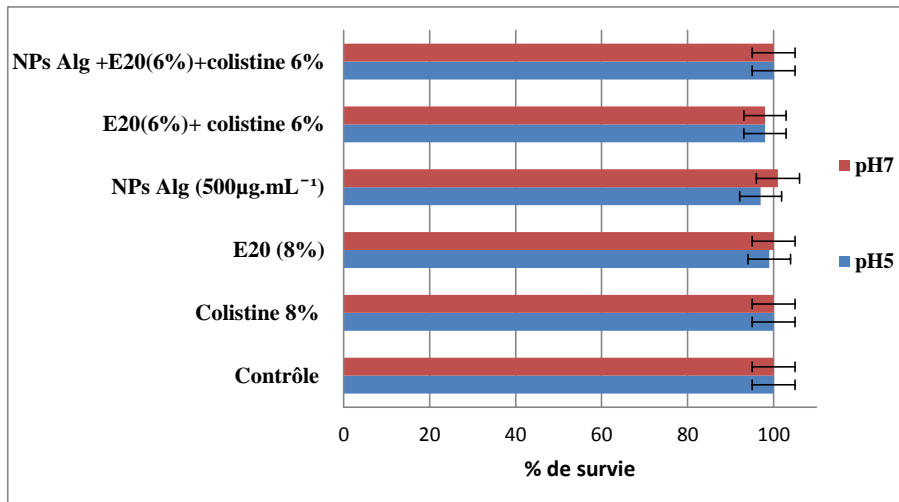


Figure 76 : Cytotoxicité de la colistine associée avec E20 sur la lignée cellulaire IPEC-1.

Des rapports récents ont mis en évidence l'efficacité de la combinaison de la colistine avec la nisine et pédiocine pour inhiber la croissance d'*E. coli* et la diminution de la cytotoxicité de la colistine en présence d'une bactériocine (448).

III-1-10) Stabilité des NPs alginate+E20 à différents pHs

La même méthodologie établie dans la partie résultats concernant la stabilité des nanoparticules d'alginate +colistine à différents pHs est suivie ici sauf que la colistine est remplacée par E20. La première étape de cette expérience est la préparation des nanoparticules alginate+E20 pour une concentration de l'extrait E20 de 60 µg.mL⁻¹ et des nanoparticules d'alginate de 500 µg.mL⁻¹. La stabilité des nanoparticules alginate+E20, et par voie de conséquence, la détermination de son activité antibactérienne, est évaluée par la mesure de la CMI. Les différentes mesures de la CMI sont représentées dans le tableau 35.

La préparation des différentes solutions a été effectuée dans un tampon acétate à pH 5, pour les solutions des nanoparticules alginate+E20+menthol, des nanoparticules alginate+E20+

thymol et des nanoparticules alginate+E20+acide lactique, l'ajustement à pH 5 a été réalisé par ajout de NaOH (6 M).

A pH 5, et durant une incubation de 60 minutes, la mesure de la CMI montre une stabilité de l'activité (pas d'évolution de la valeur de la CMI pour toutes les solutions). Par contre, lorsque le pH est ajusté à 6 par ajout de NaOH (6 M) et après incubation de 30 min, une variation de la CMI a été observée pour la solution NPs alginate+E20, avec une augmentation de la CMI d'E20, passant de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ensuite, les solutions sont incubées à pH 2 pendant 100 min par ajustement du pH avec ajout d'HCl (3 M), suivie d'une incubation pendant 15 min à pH 7, par ajout de NaOH (6 M). Une variation de la CMI a été observée pour toutes les solutions. Ainsi la CMI de la solution NPs Alg + E 20 a doublé, passant de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De la même manière, les CMI des trois solutions NPs Alg + E20+acide lactique, NPs Alg+E20 +menthol et NPs Alg+E20+thymol ont aussi doublé passant de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Par contre, l'ajustement à pH2 et incubation pendant 100 min, puis l'ajustement à pH 5 et incubation pendant 45 min, a entraîné une diminution de la CMI pour toutes les solutions. Ainsi la CMI de la solution NPs Alg+E20 a diminué de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et pareillement pour les CMI de la fraction E20 dans les trois solutions NPs Alg+E20+menthol, NPs Alg+E20+thymol et NPs Alg+E20+acide lactique, qui ont également diminué en passant de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Donc la chaîne d'incubation successive des NPs Alg+E20 à pH 5 puis à pH 6 et enfin à pH 7 a conduit à la diminution de l'activité antibactérienne de l'extrait peptidique E20. Alors qu'à pH 5, les CMI obtenues sont égales aux CMI déterminées à pH 5 avant les différentes incubations pour les différentes solutions.

Tableau 35 : Effets du pH sur l'activité antagoniste des NPs alginate + E20 + acide lactique ou le menthol/thymol sur *E. coli* 184(*mcr-1*⁺).

pH	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	pH 5 (60)	pH 6 (30)	pH 2 (120)	pH 7 (15)	pH 2 (120)	pH 5 (45)
Mélanges						
E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	ND	ND	N'est pas investigué car à pH 2 la souche <i>E. coli</i> ne pousse pas (pH très acide).	ND	N'est pas fait car à pH 2 la souche <i>E. coli</i> ne pousse pas (pH très acide).	ND
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	4	16		32		4
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Acide lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	2	2		4		2
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Menthol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	≤ 2	2		4		≤ 2
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Thymol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	≤ 2	2		4		≤ 2

Donc, on peut conclure que les valeurs de pHs, notamment les pHs 6 et 7 ont un effet négatif sur l'activité de l'extrait E20 adsorbé sur les NPs Alg. Son activité est diminuée à ces deux pHs.

D'après la littérature, les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement très stables dans des conditions acides, mais certaines d'entre elles sont facilement inactivées

dans des conditions de pHs neutre et basique (577-579). Des résultats similaires ont été rapportés pour d'autres bactériocines, telles que la plantaricine 163 produite par *Lb. plantarum* 163 et la bactériocine Si3. La plantaricine 163 est hautement thermostable (20 min à 121 °C), et il active à pH acide (pH3- à pH5) (580). La bactériocine Si3 est thermostable et il a une 'activité maximale à des pH compris entre 3 et 4,5, mais lorsque le pH est à un niveau compris entre 4,5 et 6,0, cette activité commence à diminuer rapidement et est perdue à des valeurs de pH plus élevées (581). En outre, la bactériocine L-1077 produit par *Lb. salivarius* L-1077 et présentant une activité antibactérienne contre une large gamme des BGP et des BGN, a une charge de 2,91 à pH 7 (582). Outre les bactériocines produites par les BL, d'autres bactéries produisent des bactériocines présentant des caractéristiques similaires. Ainsi selon Sharma et al. en 2018 (583), la bactériocine produite par *Bacillus subtilis* GAS101, possède un effet inhibiteur contre deux organismes indicateurs qui sont *S. epidermidis* et *E. coli*. Cette bactériocine est stable et présente une activité antibactérienne dans de larges gammes de températures (30 à 121 °C) et de pHs (2 à 12) (583). En outre, la bactériocine BL8 produite par une souche de *Bacillus licheniformis* est active contre les BGP comme *S. aureus* et à BGN comme *K. pneumoniae*. Cette bactériocine est tolérante à différents pHs et est thermostable (après une ébullition à 100 °C pendant 30 min) (584) ébullition à 30°C.

III-1-11) Stabilité des NPs alginate + E20 après traitement enzymatique

Ici, nous avons suivi la même méthodologie que lors l'évaluation de la stabilité des nanoparticules d'alginate +colistine après traitements enzymatique, mais cette fois-ci, la colistine a été remplacée par E20. Les solutions des NPs alginate+E20+ acide lactique (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), NPs alginate+E20 +menthol ou thymol (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ont été préparées et testées sur *E. coli* 184.

Le **tableau 36** résume les CMI des différentes formulations suite aux différents traitements enzymatiques. Pour la fraction E20 (60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), la CMI pour le contrôle sans enzymes et sans incubation, et la CMI pour le contrôle ayant subi une incubation à 39°C (température interne du porcelet) pendant 30 min à pH 3 puis 2 h à pH 6 n'ont pas été déterminées (résultats présentés précédemment). La valeur de la CMI pour la solution d'E20 adsorbée sur les nanoparticules a augmenté de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ce qui signifie que l'activité antibactérienne de l'extrait peptidique antimicrobienne est affectée par le pH du milieu (cf. partie stabilité aux différents pHs). Nous avons montré que l'activité de l'extrait E20 est

optimale à pH 5. Cependant, les valeurs de CMI pour les solutions d'E20 adsorbée sur les nanoparticules d'alginate associées au menthol ou le thymol sont augmentées de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement, indiquant que l'extrait E20 a perdu une partie de son activité une fois associée avec le menthol et le thymol à pH acide, malgré l'effet inhibiteur de ces acides sur la croissance bactérienne (cf. Combinaison de E20 avec les nanoparticules d'alginate et huiles essentielles). Toutefois, la CMI de la solution NPs alginate+E20 +acide lactique n'est pas affectée par le pH acide et la température. Concernant le traitement avec la pepsine, les valeurs de CMI des deux différentes formulations, (NPs Alg + E20 et NPs Alg+E20+acide lactique) sont plus élevées que les CMI obtenues avec les deux contrôles. Celles-ci ont augmenté de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement, ce qui indique que la pepsine, qui est une enzyme intervenant dans la digestion au niveau de l'estomac, dégrade en partie la chaîne peptidique et provoque une diminution de l'activité antibactérienne des différentes solutions testées. Toutefois, les CMI des deux solutions NPs Alg+E20+menthol et NPs Alg+E20+ thymol restent constantes (respectivement 4 et $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Tout comme, les CMI des 4 solutions (NPs Alg+E20, NPs Alg+E20+ acide lactique, NPs Alg+E20+menthol et NPs Alg+colistine+thymol) restent constantes également (respectivement 32 , 4 , 4 et $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) même après ajout des enzymes pancréatiques. Ce qui signifie que la trypsine et la chymotrypsine n'ont pas affecté la chaîne peptidique de l'extrait E20, contrairement à la pepsine qui augmente la CMI de la fraction E20 d'un facteur 2, passant de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans ces formulations.

Tableau 36 : Effets des enzymes digestives sur l'activité des NPs alginate+ E20 +acide lactique ou menthol sur *E. coli* 184(mcr-1⁺).

CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
Traitement enzymatique	Contrôle sans traitement (pH 7 et T 25°C)	Contrôle sans enzymes mais incubé 30min à pH 3 puis 2h à pH6*	Traitement avec pepsine incubé 30min à pH 3 puis 2h à pH6 sans ajout de trypsine+ chymotrypsin*	Traitement avec pepsine incubé 30 min à pH 3 puis 2h à pH 6 avec ajout de trypsine+ chymotrypsin*
Mélanges				
E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	ND	ND	ND	ND
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	4	16	32	32
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Acide lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	2	2	4	4
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Menthol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	1	4	4	4
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + E20 ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Thymol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	1	2	2	2
*Incubation : 39°C à 140 rpm / Pepsine 15 U/ml; Trypsine 40U/ μl ; Chymotrypsine 5U/ml ; *ND : non déterminer				

Comme il a été rapporté dans la littérature, l'activité des bactériocines produites par des bactéries lactiques est généralement abolie après traitement avec des enzymes protéolytiques (585-587). L'étude d'Abanoz et al. ((588) a révélé que le traitement de la bactériocine KT11, produite par *Ent. faecalis* KT11 avec des enzymes protéolytiques, réduit son activité vis-à-vis des souches de *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* et *Micrococcus luteus*. Cette diminution atteint 40% après traitement à la pepsine et 100% après traitement à la trypsine et l' α -chymotrypsine, à la protéase et à la protéinase K, suggérant ainsi la nature protéique du composé (588). Néanmoins, certaines bactériocines présentent une meilleure résistance à l'action des enzymes protéolytiques. Selon Isleroglu et al. en 2012 (589), l'entérochine KP, obtenue à partir d' *Ent. faecalis* KP, est stable après traitement à la pepsine (100 mg.mL⁻¹) (589).

III-2) Développement des formulations antibiotiques à base de DRS-B2 et HB2

III-2-1) Détermination de l'activité antibactérienne de DRS-B2 et HB2

L'évaluation de l'activité antibactérienne de deux peptides dermaseptiques (DRS-B2 et HB2) sur *E. coli*, 184 (*mcr-1+*) et *E. coli* ATCC 8739, a été effectuée suivant deux techniques. La technique de diffusion en milieu gélosé, qui est une méthode sensible, rapide, facile à mettre en œuvre et qui nécessite un faible volume d'échantillon. Cependant, cette technique présente des limites dues au fait que l'agarose présent dans le milieu de culture peut entraver la diffusion des molécules potentiellement actives (590). En conséquence de quoi, la recherche d'activité antibactérienne a été complétée par la technique de diffusion en milieu liquide (micro-dilution) permettant en plus de déterminer la CMI. D'après les résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé, les deux peptides dermaseptiques (de la famille B2) ont une action inhibitrice qui se traduit par l'apparition de halos d'inhibition de quelques mm. Comme cela a été rapporté dans la littérature, le DRS-B2 possède une activité antibactérienne membranaire forte contre un large spectre de bactéries à BGP et à BGN (591, 592). Après, la détermination de la sensibilité des deux souches d'*E. coli*, la détermination de la CMI a été réalisée sur des plaques de 96 puits dans des conditions bien définies (cf. matériels et méthodes).

➤ **Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de DRS-B2 et HB2 vis à-vis d'*E.coli***

Les résultats de l'évaluation des CMI sont présentés dans les tableaux 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43,44. Les deux peptides (DRS-B2 et HB2) ont d'abord été testés seuls à des concentrations différentes, afin de déterminer leurs CMI puis testés en combinaison avec les nanoparticules d'alginate. Suite aux résultats obtenus avec les solutions de nanoparticules alginate + dermaseptine, les autres solutions associant les peptides avec des nanoparticules d'alginate ont été préparées en présence de menthol et d'acide lactique. Dans toutes les solutions la concentration des nanoparticules d'alginate est de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, la concentration de menthol est de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et la concentration en acide lactique est de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tandis que la concentration de peptide DRS-B2 et HB2 est variable.

Tableau 37 : Concentration minimale inhibitrice des peptides (DRS-B2 et HB2) testés sur 2 souches d'*E. coli*.

Solutions		CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		<i>E. coli</i> ER184	<i>E. coli</i> ATCC8739
[DRS-B2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	125	7,81	3,91
	40	5	2,5
	30	7,50	3,75
[HB2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	125	7,81	3,91
	40	5	2,5
	30	7,5	3,75

En ce qui concerne l'activité des différentes solutions des deux peptides sans les nanoparticules d'alginate, les CMI de DRS-B2 et HB2 obtenues pour la souche *E. coli* 184 sont quasiment identiques, 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. Alors qu'avec la souche *E. coli* ATCC 8739, les CMI sont de 3,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 3,91 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La souche *E. coli* 184 est une souche résistante à la colistine, portant le gène (*mcr-1+*) plasmidique. Tandis que

la souche *E. coli* ATCC 8739 est une souche fécale. Elle est utilisée pour tester l'efficacité des agents antimicrobiens. Elle possède un élément d'insertion dans *ompC*, et n'exprime donc qu'*ompF* en tant que principale porine de la membrane externe. Elle a été largement utilisée dans les laboratoires depuis plus de 70 ans et également dans le domaine de production biochimique industrielle. Elle est généralement considérée sans danger et sensible aux antibiotiques, dont la colistine (476, 593).

III-2-2) Quantification de DRS-B2 et HB2 adsorbés sur les NPs alginate par HPLC

Pour déterminer la quantité maximale de chaque peptide adsorbée à la surface des nanoparticules, la méthode de chromatographie liquide à haute performance a été utilisée. La méthodologie des analyses est décrite dans la partie expérimentale III-7 (cf. partie expérimentale III-7, **Annexe 3**). Pour toutes les formulations, la concentration des nanoparticules d'alginate est de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, alors que la concentration en peptide solution-dépendante (variable selon les solutions). Les résultats obtenus par analyse chromatographique sont présentés dans la **figure 77** et le **tableau 38** pour le peptide DRS-B2.

La variation de la concentration du peptide DRS-B2 entre les solutions avant et après dialyse est due à l'exclusion de DRS-B2 par la membrane. Comme rapporté dans la littérature, la dialyse permet la séparation des molécules en fonction de leur taille (petites molécules, grosses molécules (435)). La membrane de dialyse utilisée possède un seuil de coupure de 50 KDa, elle ne permet donc pas le passage des nanoparticules d'alginate, car celles-ci présentent des tailles allant de 99 à 200 nm, mais permet la diffusion du peptide DRS-B2 seul. Lorsque ce dernier est fixé sur les nanoparticules, il ne traverse pas la membrane car la porosité est plus petite que la taille des nanoparticules associées au peptide. Pour des concentrations de $3,5$ à $190 \mu\text{g.mL}^{-1}$, l'aire des pics avant et après dialyse augmente de façon concomitante, cependant avec une différence moyenne de 16,8%. Ceci signifie que presque tout le peptide DRS-B2 se situe à la surface des NPs Alg. Alors qu'à partir de $199 \mu\text{g.mL}^{-1}$, et pour les concentrations $225 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, la concentration de DRS-B2 dans les solutions après dialyse est constante ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Celle-ci reste stable au-delà de ces concentrations. Ainsi, d'après les résultats présentés dans la **figure 76** et sur la base des calculs effectués suivant la formule obtenue à partir de la courbe de calibration ($Y=19931X$), la quantité maximale de DRS-B2 adsorbée à la surface des nanoparticules d'alginate est de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

$$Y=19931X ; Y=3998514 ; X= 3998514/19931; X= 200,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

En conclusion la quantité optimale de DRS-B2 adsorbée à la surface des nanoparticules d'alginate est de 40% par rapport à la quantité de NPs Alg (**Tableau 38**).

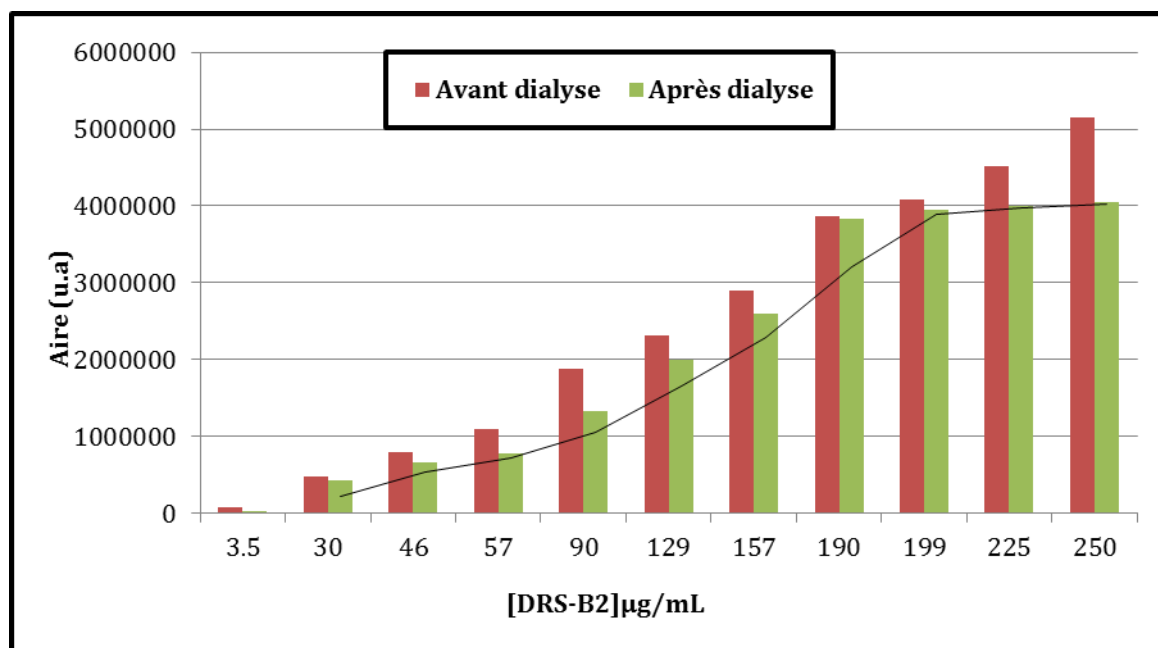


Figure 77 : Variation de l'aire du pic des différentes concentrations de DRS-B2 avant et après dialyse.

Tableau 38 : Concentration de DRS-B2 adsorbée sur les NPs alginate après dialyse.

[DRS-B2] (µg/mL) avant dialyse	Aire des pics avant dialyse	Aire pic après dialyse (Y)	[DRS-B2] (µg/mL) après dialyse (X)*	**Pourcentage de peptide DRS-B2 adsorbé sur les NPs d'alginate
199	4091385	3954214	198,3951633	40%
225	4521891	3998514	200,6178315	40%
250	5149931	4031252	202,2603984	40,4%

*Y=19931X; X=Y/19931 ; X=3998514/19931=200,61 µg.mL⁻¹
 ** % = (200,61/500) × 100 = 40%

*X : concentration (µg.mL⁻¹) de DRS-B2 après dialyse ; Y : l'aire du pic après dialyse ; α=19931

La **figure 78** et le **tableau 39** présentent les résultats de l'analyse par HPLC du peptide HB2

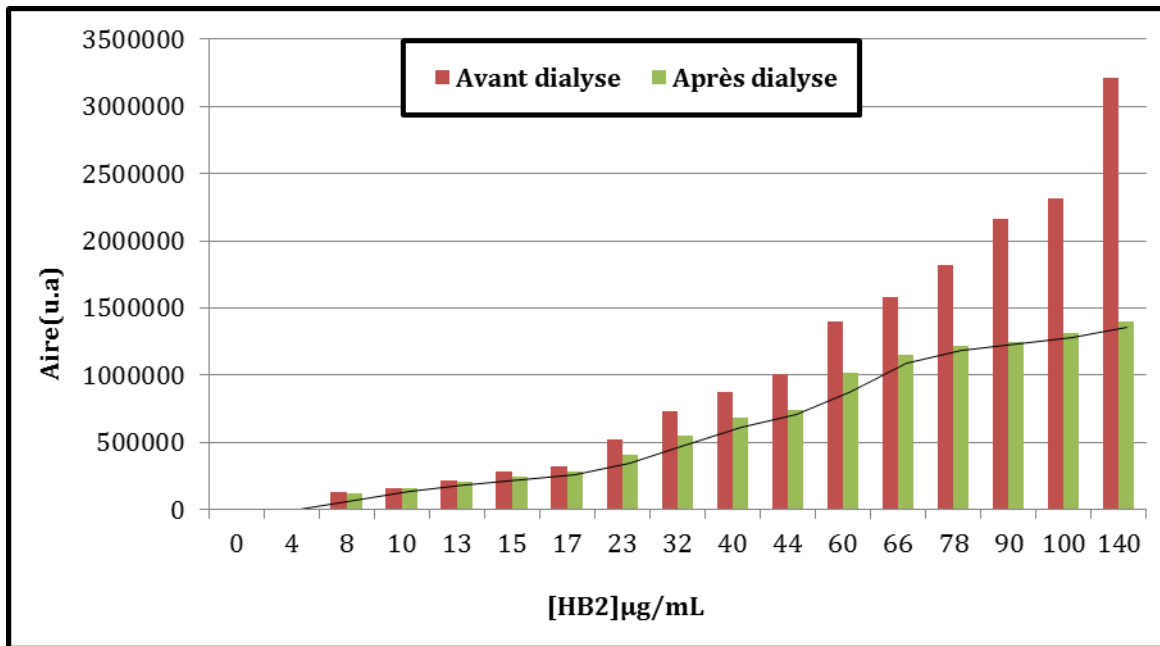


Figure 78 : Variation de l’aire du pic des différentes concentrations de HB2 avant et après dialyse.

Tableau 39 : Concentration de HB2 adsorbée sur les NPs alginate après dialyse.

[HB2] (µg/mL) avant dialyse	Aire du pic avant dialyse	Aire du pic après dialyse(Y)	[HB2] (µg/mL) après dialyse (X)*	**Pourcentage de peptide B2 adsorbé sur les NPs d'alginate
66	1578113	1154400	49,98	9,99%
78	1823761	1217870	52,73	10,54%
90	2162976	1249959	54,12	10,82%
100	2315410	1315489	56,96	11,4%
140	3215512	1401252	60,67	12,13%
*Y=23093X; X=Y/23093 ; pour Y=1401252 ; X=1401252/23093=60,67 µg.mL ⁻¹				
** pourcentage = (60,67/500) × 100 = 12,13%				

*X : concentration (µg.mL⁻¹) de HB2 après dialyse ; Y : l’aire du pic après dialyse ; α=23093

Pour les résultats obtenus avec le peptide HB2, et selon la même méthodologie d’analyse et de calcul, on observe que la quantité optimale de peptide HB2 fixée sur les nanoparticules d’alginate est de 12,13% (tableau 39). A partir d’une concentration HB2 de 66 µg.mL⁻¹, la valeur des aires du pic de 78 µg.mL⁻¹, 90 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, et 140 µg.mL⁻¹ est presque

constante et elle est égale à la valeur de l'aire du pic pour la concentration $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avant dialyse.

III-2-3) Combinaison de DRS-B2/ HB2 avec des NPs alginate

D'après les résultats du tableau 37, les deux peptides dermaseptines, isolés de la peau d'amphibiens, ont une activité antibactérienne anti-*E. coli* avec une CMI de 5 à $7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mais cette souche est résistante à ces deux peptides. Une étude antérieure, réalisée en 2008, a montré que les peptides antimicrobiens de la famille DRS-B2 sont capables d'éliminer rapidement les bactéries à Gram-positif, et à Gram-négatif, les levures, les protozoaires et les champignons filamenteux, et ne présentent pas d'activité hémolytique (388, 594). D'après les valeurs des CMI ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), une concentration de peptide de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a l'activité anti-*E. coli* la plus élevée car une telle concentration de peptide présente la CMI la plus faible.

➤ Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de DRS-B2 /HB2 +NPs alginate

En ce qui concerne l'activité des mélanges (DRS-B2+NPs Alg et HB2 +NPs Alg) et d'après les résultats présentés dans les **tableaux 40** et **41**, les CMI des différents mélanges sont deux fois plus faibles que les CMI des solutions peptidiques sans nanoparticules. Ainsi la CMI est passée de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la souche *E. coli* 184 et de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la souche *E. coli* ATCC8739. En effet, il semble que les nanoparticules d'alginate, de diamètres nanométriques, ont un effet potentialisateur en augmentant l'activité antibactérienne et diminuant ainsi les CMI de DRS-B2 et HB2. Les nanoparticules d'alginate ont joué le rôle de vecteur de transport pour délivrer ces molécules protéiques à la membrane bactérienne. Une fois l'alginate anionique mélangé avec le peptide dermaseptine cationique, une interaction électrostatique se produit. Quand ce complexe est à proximité de la membrane bactérienne anionique, une cinétique de relargage peptidique survient permettant une interaction entre le peptide (DRS-B2/HB2) cationique et la bicouche phospholipidique membranaire (388).

D'après la littérature, le peptide DRS-B2 a une CMI de $0,8 \mu\text{M}$ ($3,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pour *E. coli* B (388) et une CMI de $1,5 \mu\text{M}$ ($5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pour *E. coli* K12 (595, 596). Avec notre souche, la CMI de DRS-B2 est de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour *E. coli* 184 et de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour ATCC8739.

Tableau 40 : CMI de peptide DRS-B2 + NPs alginate (DRS-B2+NPs Alg) à différentes concentrations testées sur 2 souches d'*E. coli*.

		CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
Solutions	[DRS-B2]	ER184	ATCC8739
NPs alginate ($500\mu\text{g.mL}^{-1}$) + [DRS-B2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	125	3,91	1,95
	40	2,5	1,25
	30	3,75	1,87

Tableau 41: CMI de peptide HB2+NPs alginate (HB2+NPsAlg) à différentes concentrations testées sur les 2 souches d'*E. coli* cibles utilisées.

		CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
Solutions	[HB2]	ER184	ATCC8739
NPs alginate ($500\mu\text{g.mL}^{-1}$) + [HB2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	125	3,91	1,95
	40	2,5	1,25
	30	3,75	1,87

III-2-4) Combinaison de DRS-B2/ HB2 avec des NPs alginate + menthol /acide lactique

Au regard des résultats obtenus et indiqués dans les Tableaux 37, 40 et 41, des nouvelles combinaisons ont été testées et les résultats des CMIs obtenues sont présentés dans les tableaux 42, 43, 44 et 45.

Tableau 42: CMI des mélanges des NPs alginate avec le menthol et le peptide DRSB2 de différentes concentrations testés sur 2 souches d'*E. coli*.

Solutions	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	[DRS-B2]	ER184	ATCC8739
NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + [DRS-B2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + Menthol ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$)	125	1,95	0,97
	40	1,25	0,62
	30	1,87	0,94

Tableau 43: CMI des mélanges des NPs alginate avec le menthol et le peptide HB2 à différentes concentrations testés sur 12 souches d'*E. coli*.

Solutions	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	[HB2]	ER184	ATCC8739
NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + [HB2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + Menthol ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$)	125	1,95	0,97
	40	1,25	0,62
	30	1,87	0,94

L'ajout du menthol à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans des solutions de nanoparticules d'alginate + dermaseptine (DRS-B2/HB2) permet de diminuer la CMI d'un facteur deux par rapport aux CMI obtenues pour des solutions de nanoparticules + dermaseptine, et de 4 fois par rapport aux CMI des peptides seuls. Ainsi, les CMI observées sont abaissées de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la souche *E. coli* 184, et de $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $0,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la souche *E. coli* ATCC8739. Ce qui signifie que le menthol est efficace pour activer et stimuler l'inhibition de la croissance bactérienne, et que le menthol seul à cette concentration ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) n'a pas d'effet inhibiteur.

Tableau 44 : CMI des mélanges des NPs alginate avec l'acide lactique et le peptide DRS-B2 à différentes concentrations testés sur 2 souches d'*E. coli*.

Solutions	[DRS-B2]	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		ER184	ATCC8739
NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + [DRS-B2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + Acide lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	125	1,95	0,97
	40	1,25	0,62
	30	1,87	0,94

Tableau 45 : CMI des mélanges des NPs alginate avec l'acide lactique et le peptide HB2 à différentes concentrations testés sur 2 souches d'*E. coli*.

Solutions	[HB2]	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		ER184	ATCC8739
NPs alginate ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + [HB2] $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + Acide lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	125	1,95	0,97
	40	1,25	0,62
	30	1,87	0,94

L'ajout d'acide lactique à une concentration non inhibitrice ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), en augmentant le pH du milieu dans les solutions contenant NPs Alg +DRS-B2/HB2, permet également de diminuer les CMI des deux dermaseptines d'un facteur 2 pour les deux souches d'*E. coli*. Cette diminution de la CMI après ajout d'une huile essentielle ou d'un acide organique signifie que ces composés améliorent, voire potentialisent, l'activité antibactérienne des mélanges peptides/nanoparticules. Le menthol, qui est un alcool monoterpénique, possédant plusieurs utilisations notamment comme ingrédient dans certains médicaments sur ordonnance (597). Celui-ci a un large spectre d'activité contre divers micro-organismes, y

compris les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif ainsi que les champignons (479). En effet, la complexité chimique des huiles essentielles diminue le risque de développement de résistances (467). Dans des études antérieures, le menthol a été immobilisé sur des nanoparticules de diamant pour induire la réduction de la formation de biofilm plus efficacement que l'ampicilline (598). Par ailleurs, l'acide lactique, qui est un acide organique utilisé dans l'industrie alimentaire comme additif en tant qu'antioxydant et acidifiant (599), possède également une action antibactérienne. Une fois dans la cellule, l'acide lactique libère des ions H^+ qui acidifient le contenu cellulaire et contraignant la bactérie à utiliser son énergie pour contrecarrer cette baisse de pH (346).

Les huiles essentielles et les acides organiques sont des agents antibactériens à des concentrations élevées et des agents potentialisateurs de l'inhibition de la croissance bactérienne à plus faibles concentrations, en agissant sur le pH et la membrane cytoplasmique, lorsqu'ils sont mélangés avec d'autres molécules.

Suivant les résultats obtenus dans les tableaux ci-dessus (42, 43, 44 et 45), on a testé différentes solutions, d'où les deux peptides ont été mélangés et ils ont combinée avec les nanoparticules d'alginate et le menthol une fois et d'autre fois avec l'acide lactique. Les différents résultats sont représentés dans le tableau 46.

Le mélange des deux peptides dermaseptiques (DRS-B2 +HB2) avec les nanoparticules d'alginate et le menthol ou l'acide lactique a pour effet d'augmenter l'activité antibactérienne contre les deux souches d'*E. coli*. La CMI des deux peptides a diminué pour atteindre une valeur inférieure à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tableau 46: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides (DRS-B2+HB2) avec des NPs alginate + menthol/acide lactique testés sur 2 souches d'E. coli.

Solutions	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	<i>E. coli</i> 184	<i>E. coli</i> ATCC8739
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) +DRS-B2 ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$) + HB2 ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$)+Menthol ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$)	≤ 1	$\leq 0,5$
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) +DRS-B2 ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$) + HB2 ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$)+Menthol ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$)	≤ 1	$\leq 0,5$
NPsAlg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) +DRS-B2 ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$) + HB2 ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$) + Acide lactique ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$)	≤ 1	$\leq 0,5$
NPsAlg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) +DRS-B2 ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$) HB2 ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$) + Acide lactique ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$)	≤ 1	$\leq 0,5$

III-2-5) Activité hémolytique des NPs alginate, DRS-B2 et HB2

Des études antérieures ont montré que le peptide DRS-B2 n'est pas cytotoxique pour les érythrocytes du rat ([388](#), [594](#)). En outre, l'étude réalisée par Wang et al. ([600](#)) a démontré que l'alginate de sodium n'a pas un effet d'hémolyse sur les érythrocytes de cheval à une concentration de 2 mg/mL ([600](#)). Selon l'étude de Liao et al. ([601](#)), les nanoparticules d'alginate combinée avec des coquilles d'oxyde de fer n'ont aucune activité hémolytique sur les érythrocytes humains ([601](#)).

Pour vérifier que les différentes combinaisons ne présentaient pas d'activité hémolytique dans la plage des concentrations en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ telles qu'elles sont utilisées dans nos conditions, des globules rouges humains ont été isolés et incubés avec différentes concentrations de nanoparticules d'alginate avec ou sans DRS-B2/HB2. L'activité hémolytique des combinaisons est présentée dans la **figure 79**.

De façon générale, les nanoparticules d'alginate à une concentration de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ n'ont aucune activité hémolytique sur les érythrocytes humaines, le pourcentage d'hémolyse est $\leq 0,5\%$. Le DRS-B2 présente une activité hémolytique de 5 % et 7,5% sur les érythrocytes humaines pour des concentrations de 104 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 208 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. Cependant, sa combinaison avec les nanoparticules d'alginate a diminué son activité hémolytique de 5% et 7,5% à 1% et 4% respectivement.

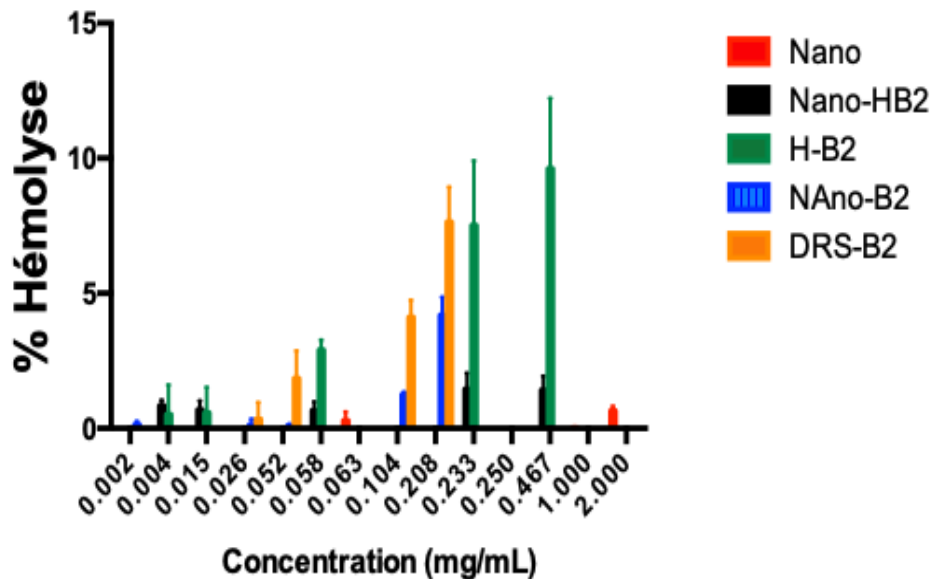


Figure 79 : Effet des NPs alginate seules ou en combinaison avec DRS-B2/HB2 sur l'hémolyse des globules rouges : Les érythrocytes humaines.

Le pourcentage d'hémolyse des érythrocytes avec le peptide HB2 est de 7,5% et 10% pour des concentrations de 233 et 467 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. De la même manière, sa combinaison avec des nanoparticules d'alginate a diminué le pourcentage d'hémolyse à 1,5%. Comme il a été rapporté dans la littérature, de nombreux peptides antimicrobiens (PAM) présentent une activité antibactérienne pouvant entraîner une activité hémolytique. Cependant, la combinaison avec des nanoparticules peut constituer une bonne stratégie pour minimiser les caractéristiques indésirables des PAMs (450). Donc, d'après les résultats obtenus dans la figure 15, les nanoparticules d'alginate ne présentent aucune activité d'hémolyse sur les globules rouges humains et leur combinaison avec DRS-B2/HB2 permettait de diminuer l'activité hémolytique de ces peptides.

III-2-6) Test de cytotoxicité de DRS-B2 et HB2 sur les lignées deux cellulaires HT-29 et IPEC-1

La cytotoxicité des différentes solutions a été testée sur deux types de lignées cellulaires. En effet, nous avons utilisé une lignée animale, plus exactement porcine (IPEC-1) et une ligne humaine (HT-29). Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 80, 81, 82, 83, 84 et 85.

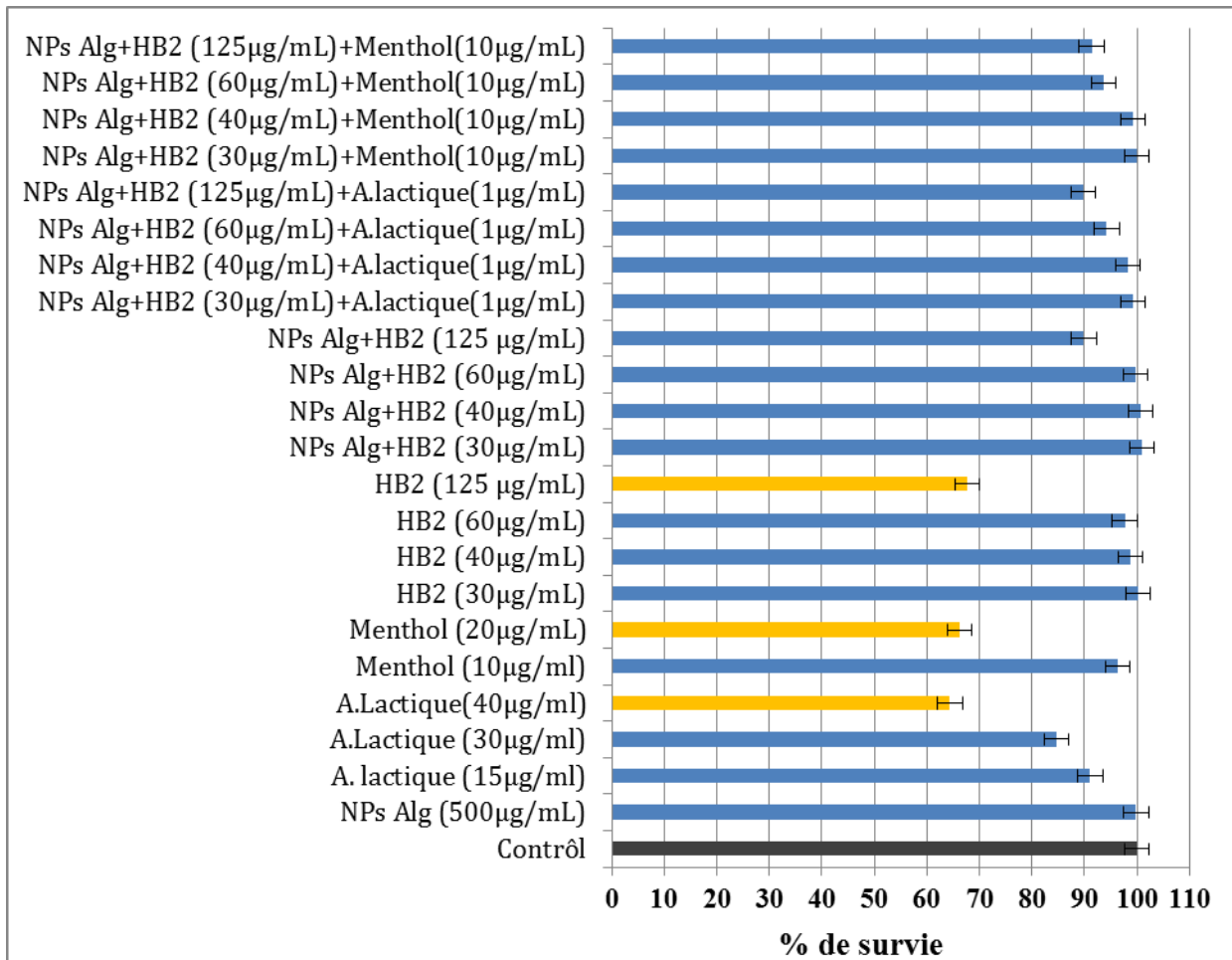


Figure 80 : Cytotoxicité des différentes solutions de HB2 sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1.

De manière générale, nous constatons que les différentes combinaisons avec les nanoparticules d'alginate ne sont pas toxiques pour les cellules de la lignée IPEC-1(602), le pourcentage de survie est compris entre 89 % et 100%. De plus, nous pouvons noter que les nanoparticules d'alginate (500 µg.mL⁻¹) sont totalement dépourvues d'effet cytotoxique avec un pourcentage de survie de 100%. Cependant, il convient de remarquer que le pourcentage de survie cellulaire est inférieur à 67% avec le menthol (20 µg.mL⁻¹), l'acide lactique (40

$\mu\text{g.mL}^{-1}$) et le peptide HB2 à $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ces valeurs signifient que ces concentrations ont un effet délétère sur les cellules animales porcines (IPEC-1) avec une mortalité atteignant près de 33%. Cependant, le pourcentage de mortalité a diminué de 33% à 11%, une fois le peptide HB2 mélangé avec les nanoparticules, alors que ce pourcentage diminue encore plus (à 9%), lorsque le menthol ou l'acide lactique est additionné au mélange NPs Alginate+HB2.

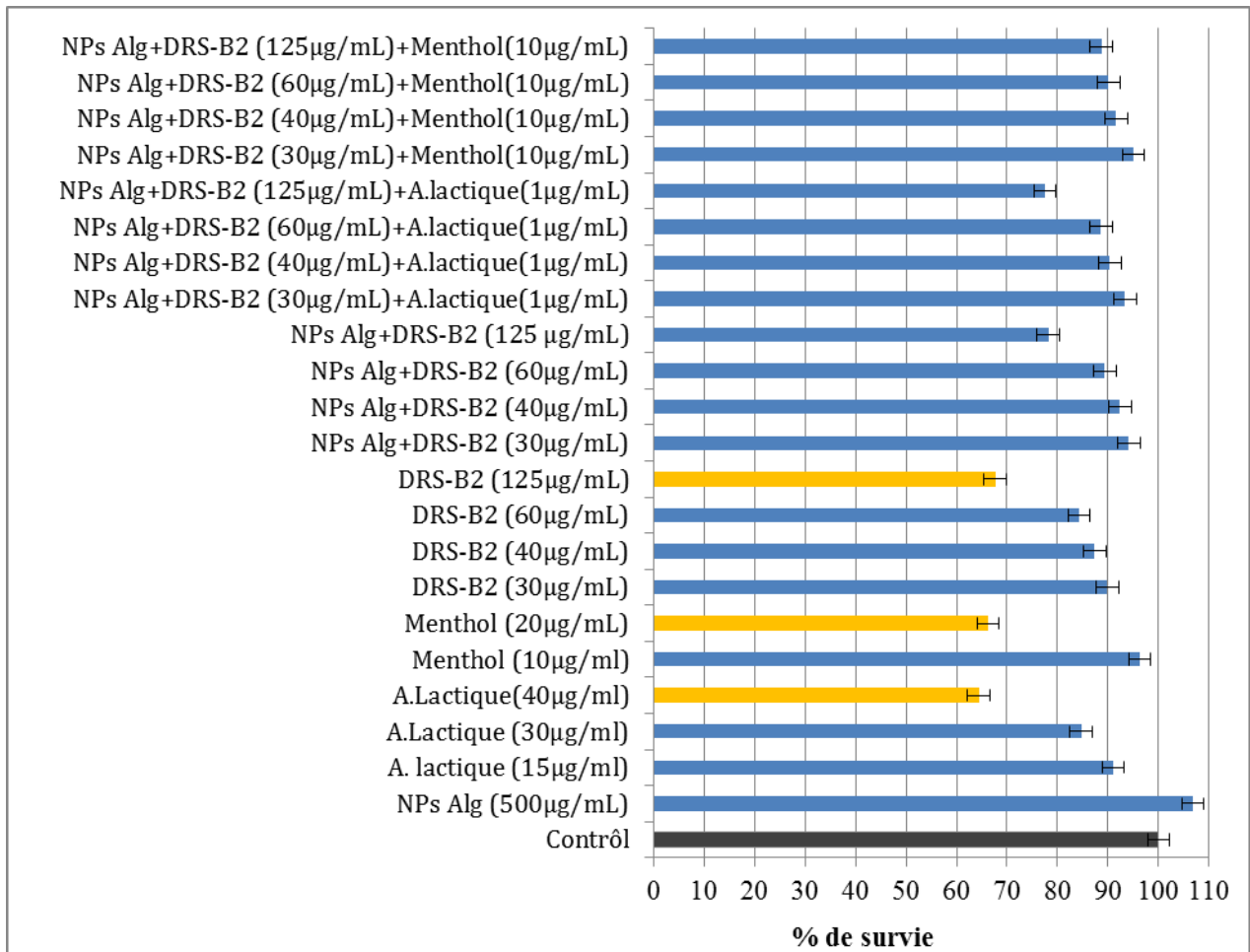


Figure 81 : Cytotoxicité des différentes formulations de DRS-B2 sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1.

De façon générale et en comparant avec les résultats de cytotoxicité de la **figure 80**, les pourcentages de survie pour le peptide DRS-B2 à $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sont de 84,32% et 67,67%, respectivement. D'autre part, ces pourcentages augmentent, lorsque des mélanges de peptides +NPsAlg sont utilisés pour atteindre des pourcentages de survie de 89,9% et 78,17% respectivement, permettant ainsi de réduire la quantité du peptide, donc sa cytotoxicité, et d'améliorer l'innocuité des mélanges. Ce résultat confirme que les

nanoparticules d'alginate ont un effet positif sur la survie des cellules épithéliales porcines IPEC-1.

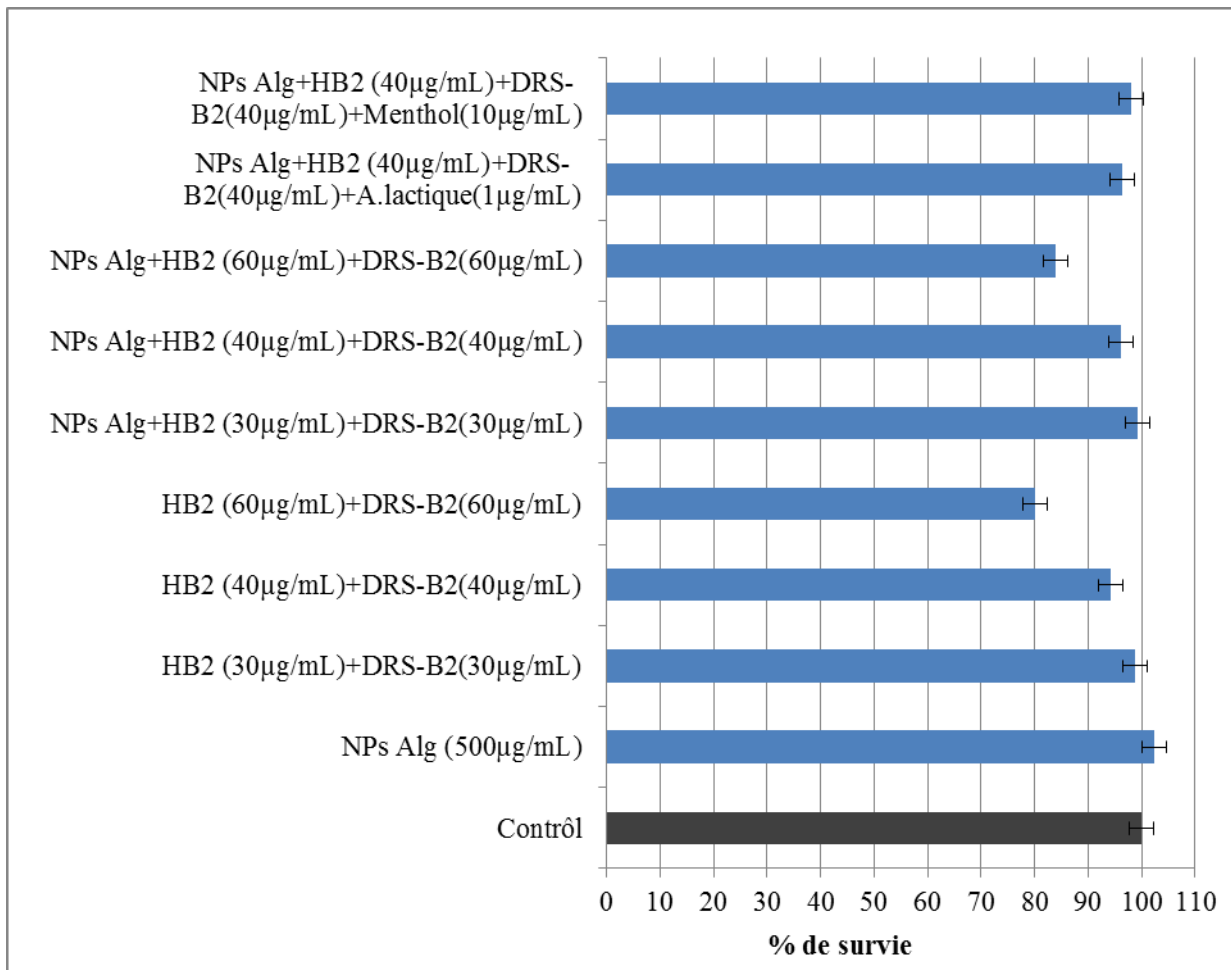


Figure 82 : Cytotoxicité *in vitro* de différentes formulations de HB2 et DRS-B2 sur la lignée cellulaire IPEC-1.

D'après les résultats mentionnés de la figure 82, nous pouvons confirmer que les combinaisons de HB2 ou DRS-B2 avec les nanoparticules d'alginate et le menthol ou l'acide lactique, ne présentent pas d'effets toxiques sur les cellules épithéliales porcines IPEC-1.

Un autre modèle de lignée cellulaire a été utilisé dans cette étude. Il s'agit de la lignée cellulaire humaine HT-29, qui sont des cellules cancéreuses colorectales humaines. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 83, 84 et 85.

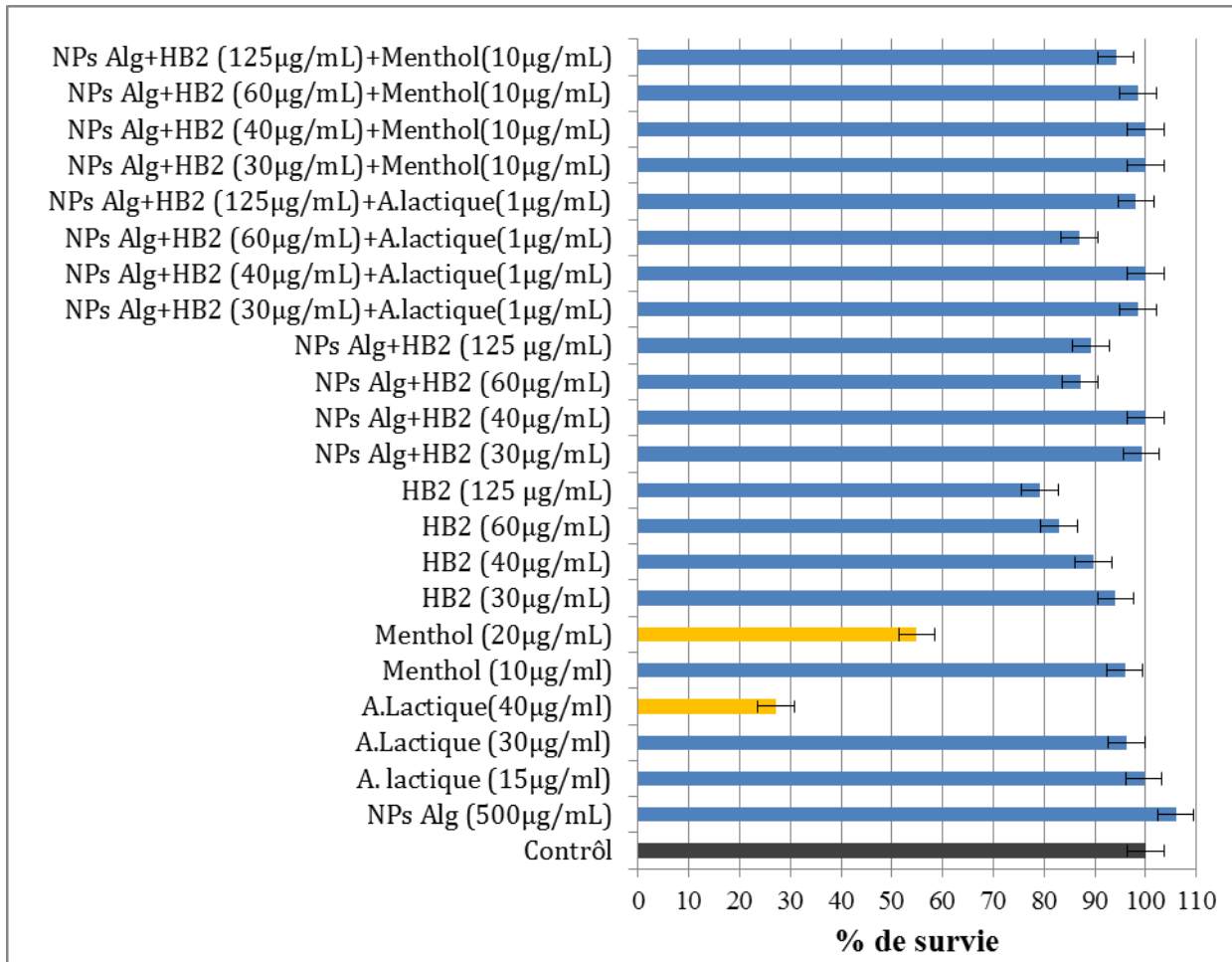


Figure 83 : Cytotoxicité des différentes formulations de HB2 sur la lignée cellulaire humaine HT-29.

La figure 82 montre un pourcentage de viabilité supérieur à 100%, pour les nanoparticules d'alginate. Nous pouvons imaginer qu'il s'agit d'un effet de stimulation sur le métabolisme des cellules provoquant ainsi une élévation de l'activité enzymatique impactant sur le résultat du test. Toutefois, ces résultats confirment ceux obtenus sur la lignée cellulaire porcine IPEC-1, confirmant que les nanoparticules d'alginate ne sont pas cytotoxiques. Comme précédemment, une concentration de menthol supérieure à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ provoque une toxicité de 50% pour les cellules humaines HT-29. On notera également que l'acide lactique, avec des concentrations inférieures à $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ne présente pas de cytotoxicité apparente avec un pourcentage de survie supérieur à 95% sur les cellules HT-29. A noter, le peptide HB2 n'a pas d'effet toxique sur les cellules humaines HT-29 pour des concentrations inférieures à $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ici également, le pourcentage de survie augmente de 79% à 89% pour les mélanges peptide + nanoparticules d'alginate.

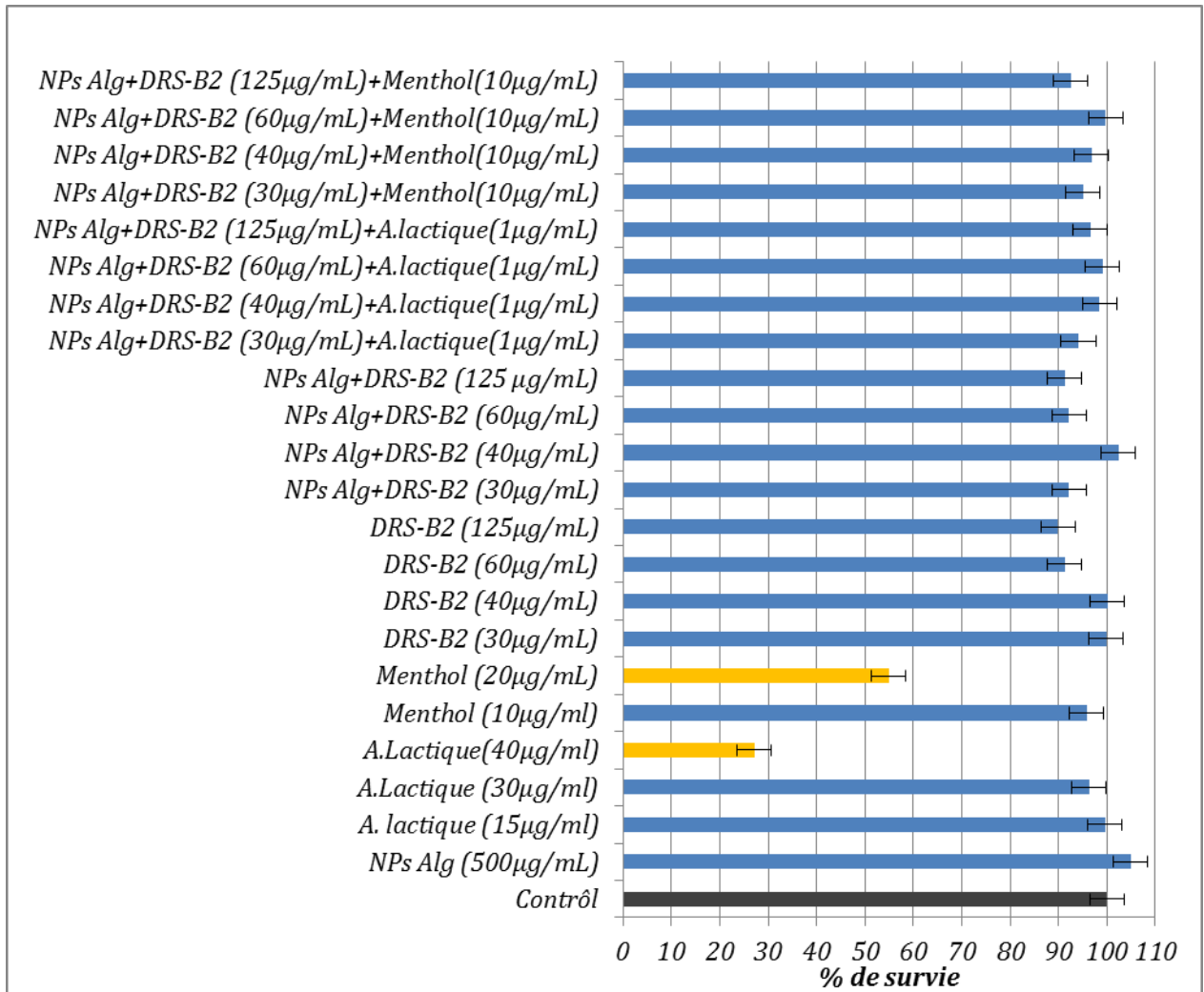


Figure 84 : Cytotoxicité des différentes formulations de DRS-B2 sur la lignée cellulaire HT-29.

Le peptide DRS-B2 ne présente pas d'effet cytotoxique sur la lignée cellulaire HT-29 et les résultats de viabilité cellulaire varient entre 90% et 100% pour les différents mélanges peptides + nanoparticules + menthol ou acide lactique (**Figure 84**).

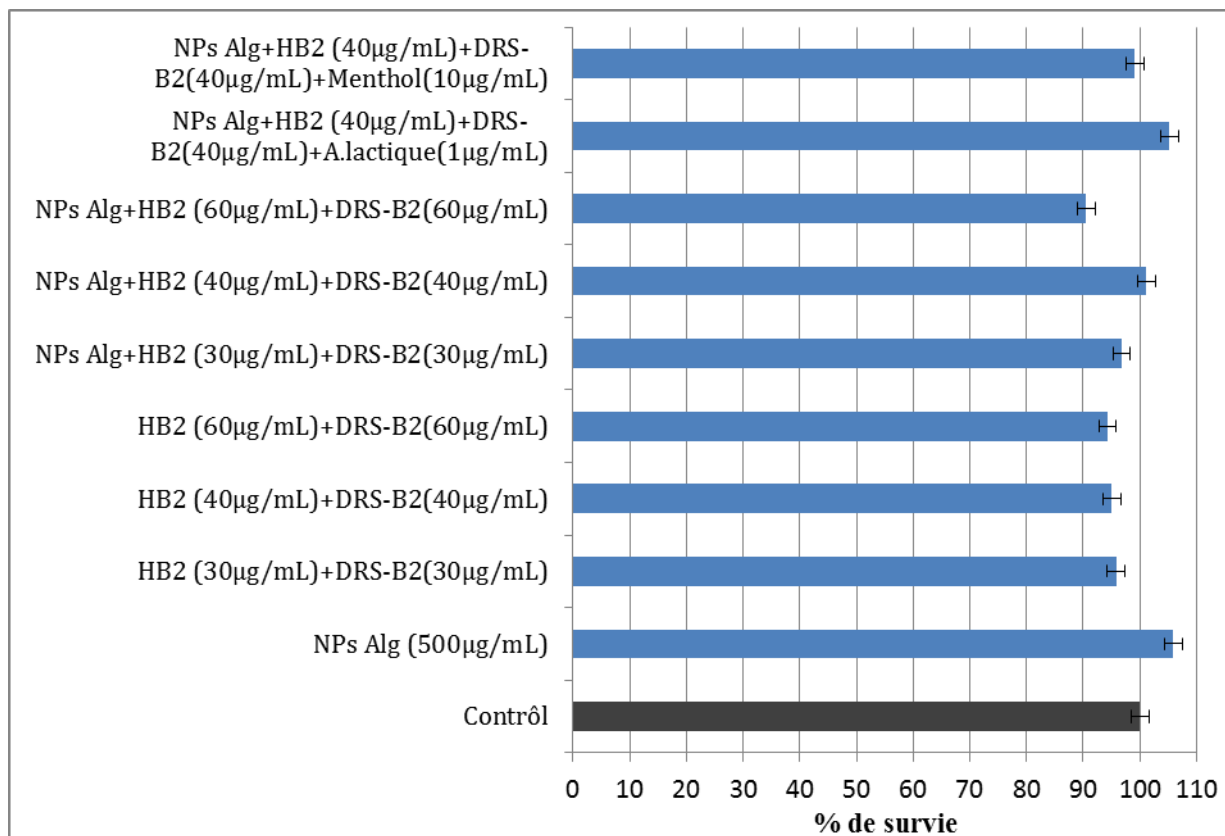


Figure 85 : Cytotoxicité *in vitro* des différentes formulations de HB2 et DRS-B2 sur la lignée cellulaire HT-29.

En conclusion, les différentes formulations de nanoparticules d'alginate + dermaseptines (DRS-B2 ou HB2), associées avec le menthol ou l'acide lactique ont une faible cytotoxicité qui ne dépasse pas 10% pour des concentrations en peptide (DRS-B2 /HB2) inférieures à 125 µg.mL⁻¹(**Figure 85**). Selon l'étude de Charpentier et al. (1998), la cytotoxicité de la dermaseptine B3 et B4 vis-à-vis des cellules de mammifères, a été évaluée par leur capacité à inhiber l'incorporation de la thymidine dans des cellules MCF-7 (cellules cancéreuses du sein) transformées humaines (592). Les résultats ont révélé une cytotoxicité de 50% à une concentration en DRS-B3 de 10µM (27,8 µg.mL⁻¹). Cependant, l'étude de Galanth et al. (2009), a montré qu'une concentration de 10 µM (39,7 µg.mL⁻¹) en DRS-B2 n'est pas toxique sur des cellules CHO (Ovaire de Hamster Chinois). Par contre 50 % des cellules CHO étaient tuées par 50 µM (198,5 µg.mL⁻¹) de DRS-B2 après 24 heures d'incubation (388). On peut conclure que les combinaisons des nanoparticules polysaccharides avec des peptides en présence d'huiles essentielles et des acides organiques, ne sont pas toxiques.

III-2-7) Stabilité des NPs alginate + DRS-B2 à différents pHs

Comme pour la colistine et E20, la même méthodologie a été suivie pour DRS-B2. La première étape a été la préparation des nanoparticules alginate-DRS-B2 telle que décrite dans la section 10.8 de la partie expérimentale. La concentration de DRS-B2 utilisée durant la préparation des nanoparticules est de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, et les nanoparticules étant à une concentration de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La stabilité des nanoparticules alginate-DRS-B2 a été évaluée par la détermination de la valeur de la CMI de chaque solution après incubation à différents pH pour différents temps. La stabilité des nanoparticules alginate-DRS-B2 et par conséquent la détermination de son activité antibactérienne se traduit par la mesure de la CMI. Les nanoparticules qualifiées de « stables » assurent une complexation efficace de DRS-B2 contrôlant son activité antibactérienne. Les différentes mesures de la CMI sont représentées dans le **tableau 47**. La préparation des différentes solutions a été effectuée à pH 7 pour les solutions de nanoparticules alginate+DRS-B2+menthol et nanoparticules alginate+DRS-B2+acide lactique, l'ajustement à pH 7 a été réalisé par ajout de NaOH.

A pH 7 et durant une incubation de 60 minutes, la mesure de la CMI montre une stabilité dans l'activité (pas d'évolution de la valeur de la CMI pour toutes les solutions). Par contre, lorsque le pH est ajusté à 2 par ajout de HCl, et une incubation de 100 min, suivie d'une incubation à pH 5 pendant 45 min, une variation de la CMI a été observée pour les trois solutions (sauf la solution NPs Alg+DRS-B2+acide lactique). La CMI de la solution DRS-B2 a doublé, passant de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De la même manière, les CMI des deux solutions NPs Alg+DRS-B2 et NPs Alg+DRS-B2+menthol ont aussi doublé respectivement de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Donc l'incubation successive des NPs Alg-DRS-B2 à pH2 et à pH 5 a diminué l'activité antibactérienne du peptide DRS-B2. Par contre, les valeurs des CMI des mélanges NPs Alg+DRS-B2+ acide lactique ne sont pas altérées. A pH 6 et 7, les CMI obtenues sont égales aux CMI obtenues à pH5 pour les différentes solutions

Donc, on peut conclure que le pH très acide (pH 2) a un effet négatif sur l'activité de DRS-B2 mais une fois ce dernier est adsorbé sur les nanoparticules, cet effet est diminué légèrement. D'après les résultats obtenus précédemment dans la partie stabilité des nanoparticules à pH 7 et d'après la littérature, la stabilité de l'alginate dépend fortement de la température, du pH et de la présence de contaminants. Les liaisons glycosuriques sont susceptibles de rompre

lorsque l'alginate est utilisé en milieu acide ou basique. Pour à un pH au-dessous de 3, un risque d'hydrolyse des chaînes glycosuriques est très probable.

Tableau 47 : Effets du pH sur l'activité des NPs alginate + DRS-B2 + acide lactique ou le menthol sur *E. coli* 184 (*mcr-1*).

CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
pH	pH 7	pH 2	pH 5	pH 6	pH 7
Temps d'incubation (min)	(60)	(100)	(45)	(30)	(15)
Mélanges					
DRS-B2 ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	5	N'est pas fait car a pH 2 la souche <i>E. coli</i> ne pousse pas (pH très acide)	10	10	10
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + DRS-B2 ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	2.5		5	5	5
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + DRS-B2 ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Ac. lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	1.25		1.25	1.25	1.25
NPs Alg ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + DRS-B2 ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + Menthol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	1.25		2.5	2.5	2.5

III-2-8) Stabilité des NPs alginate+DRS-B2 après traitement enzymatique

Nous avons évoqué précédemment l'importance de maintenir une bonne stabilité colloïdale des nanoparticules lors des tests d'activité antimicrobienne. Cette considération est cependant très rarement prise en compte lors des tests décrits dans la littérature. Nous avons étudié l'effet des enzymes digestives sur l'activité des NPs Alg+DRS-B2 avec l'acide lactique ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou le menthol ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sur *E. coli* 184 pendant deux temps d'incubation à deux pH (3 et 6). Trois enzymes ont été utilisées : la pepsine (enzyme digestive de l'estomac active à pH 3), la trypsine et la chymotrypsine (enzymes synthétisées dans le pancréas et sécrétées dans l'intestin grêle actives entre pH 6 et 8). Différentes conditions ont été établies afin qu'elles soient les plus proches possibles des conditions retrouvées dans le tractus digestif du porcelet selon Zhong et al. (2017) (526).

Le **tableau 48** regroupe les résultats de la CMI des différentes formulations suite aux différents traitements enzymatiques. Pour la solution DRS-B2 ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$), la CMI pour le contrôle sans enzymes et sans incubation est de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Lorsque ce contrôle subit une incubation à 39°C pendant 30 min à pH 3 puis 2 h à pH 6, la CMI a augmenté pour atteindre $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Cependant, les valeurs de CMI pour les solutions de DRS-B2 adsorbé sur les nanoparticules d'alginate associées au menthol ou à l'acide lactique sont restées de $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ce qui signifie que le peptide DRS-B2 a perdu une partie de son activité avec les incubations à pH acide tandis que son association avec les nanoparticules d'alginate lui confère une sorte de protection qui lui permet de conserver une partie de son activité à une température élevée.

Tableau 48 : Effets des enzymes digestives sur l'activité de DRS-B2+ NPs alginate + acide lactique ou le menthol sur *E. coli* 184(*mcr-I*⁺).

CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Traitement enzymatique	Contrôle sans traitement	Contrôle sans enzymes mais incubé 30min à pH 3 puis 2h à pH6*	Traitement avec pepsine incubé 30min à pH 3 puis 2h à pH6 sans ajout de trypsine+ chymotrypsin*	Traitement avec pepsine incubé 30 min à pH 3 puis 2h à pH 6 avec ajout de trypsine+ chymotrypsin*
Mélanges				
DRS-B2 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	5	10	10\geq	10\geq
NPs Alg (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + DRS-B2 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2,5	2,5	5	10
NPs Alg (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + DRS-B2 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + Acide lactique (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1,25	1,25	2,5	2,5
NPs Alg (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + DRS-B2 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + Menthol (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1,25	1,25	2,5	2,5
*Incubation : 39°C à 140 rpm / Pepsine 15U/ml; Trypsine 40U/μl; Chymotrypsine 5U/ml				

Concernant le traitement avec la pepsine, les valeurs de CMI des différentes formulations sont plus élevées que les CMI obtenues avec les deux contrôles. Celles-ci sont augmentées d'un facteur de 2, ce qui indique que la pepsine, qui est une enzyme intervenant dans la digestion au niveau de l'estomac, dégrade en partie la chaîne peptidique et provoque une diminution de

l'activité antibactérienne de différentes solutions testées. Au contraire, les CMI des deux solutions NPs alginate+DRS-B2+menthol et NPs alginate+DRS-B2+acide lactique restent constantes ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) même après ajout des deux enzymes pancréatiques. Contrairement à l'activité des deux solutions DRS-B2 et DRS-B2+NPs Alg dont les CMI ont augmenté d'un facteur deux et passent de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En conclusion, les enzymes digestives influent l'activité de DRS-B2 seul mais les combinaisons associant ce dernier avec des nanoparticules d'alginate et le menthol ou l'acide lactique permet de conserver son activité malgré l'action des enzymes testées probablement par un phénomène d'enrobage ([603](#)).

PARTIE V : DISCUSSION GENERALE

La surconsommation d'antibiotiques à large spectre, associée à une surutilisation dans le domaine de l'élevage intensif a provoqué une recrudescence de la résistance aux antibiotiques, avec l'apparition d'une multitude de souches présentant des phénotypes de multirésistance à de nombreux agents antimicrobiens. Ainsi, les infections bactériennes sont devenues plus difficiles à traiter en raison de l'émergence de l'antibiorésistance. La recherche de stratégies alternatives aux antibiotiques est urgente pour atténuer ce phénomène mondial. Des options thérapeutiques alternatives, y compris des nanoparticules, des bactériocines utilisées indépendamment ou en association avec des antibiotiques ou des agents antimicrobiens doivent être explorées de manière approfondie.

Notre étude s'est penchée sur le rôle des nanoparticules d'alginate (polysaccharidiques) dans le but de potentialiser l'activité antibactérienne de la colistine, un antibiotique hautement efficace contre les BGN (604). Cette potentialisation peut être obtenue en association avec des bactériocines (E20) et/ou des peptides antimicrobiens afin de contourner le développement du phénomène de résistance aux antibiotiques et/ou d'augmenter leur pouvoir antimicrobien. Dans nos travaux, nous avons synthétisé des nanoparticules d'alginate par le procédé de Top-Down. Cette technique de synthèse, simple et rapide, permet de préparer une quantité importante (plusieurs grammes) en une seule étape. Les nanoparticules d'alginate synthétisées ont été caractérisées en solution en mesurant leur taille moyenne et leur charge de surface par diffusion dynamique de lumière (DDL). Une analyse par microscopie électronique à balayage, nous a permis également de vérifier l'élaboration des nanoparticules de différentes formes.

D'après la littérature, les nanoparticules d'alginate sont des nanoparticules biodégradables, biocompatibles, qui ne sont pas toxiques et pouvant être utilisées dans de nombreuses applications pharmaceutiques et biomédicales telles que les systèmes d'administration de médicaments.

Comme les nanoparticules peuvent avoir des utilisations potentielles dans les domaines pharmaceutique et biomédicale (245), Plusieurs études ont décrit l'application des nanoparticules de nature polysaccharidiques comme moyens de distribution des médicaments (394) et pouvant jouer le rôle de biocapteurs (605).

Selon les études de Youta et al. (2012) et Nicolas et al. (2017) des nanoparticules de maltodextrines, des polysaccharides naturels, ont été utilisées comme des excipients pharmaceutiques, des stabilisateurs d'émulsion et des agents de liaison en cosmétologie. Ces nanoparticules sont biocompatibles et biodégradables, leurs formes dérivées ont été très étudiées pour un usage dans de nombreuses autres applications comme la diffusion de protéines anticancéreuses (606, 607). En outre, un autre modèle de nanoparticules polysaccharidiques a été étudié, le chitosane. Il s'agit ici aussi d'un polysaccharide biocompatible et biodégradable, non toxique, et qui est utilisé dans des formulations de certains médicaments pris par voie orale (608). En plus, le chitosane a des effets bactériostatiques/bactéricides contre un large éventail de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.

Selon Rojo et al. (2008), les nanoparticules ont été utilisées pour l'encapsulation et le greffage chimique de molécules dérivées de plantes et de composés phénoliques (609). A titre d'exemple, le carvacrol, une huile essentielle, a été encapsulé dans des nanoparticules de chitosane afin de déterminer ses activités antioxydantes et antibactériennes par rapport à sa forme non encapsulée (610).

Durant nos travaux, nous avons observé que la combinaison de nanoparticules d'alginate, chargées négativement (426), avec la colistine, chargée positivement (611) permettait d'obtenir des nanoparticules capables de potentialiser l'activité antibactérienne de la colistine et lui conférer une certaine protection contre l'environnement gastrique et intestinal lors de son passage dans le tractus digestif (425, 612).

D'après les résultats obtenus lors de l'association de la colistine avec des petites molécules, nous avons observé que la combinaison de cet antibiotique avec des agents antimicrobiens (des huiles essentielles, des acides organiques, des polyamines, etc....) se révèle être une méthode relativement efficace pour contrôler les souches résistantes. Ces agents antimicrobiens pourraient être des alternatives thérapeutiques pour limiter l'émergence de la multi-résistante bactérienne et principalement l'émergence de souches *E. coli*, résistante à la colistine.

Un grand nombre de publications abordent l'utilisation des huiles essentielles et des antibiotiques en tant que thérapie combinatoire avec l'obtention d'excellents résultats. Notamment des réductions significatives de la posologie d'antibiotiques nécessaires pour éliminer complètement les agents pathogènes multirésistants (613, 614). Par ailleurs, certaines

études ont montré que l'usage des huiles essentielles pouvait s'avérer une solution viable pour contrer le phénomène de résistance aux antimicrobiens chez *E. coli* (615). Actuellement, plus de 3 000 huiles essentielles (HE) sont répertoriées, certaines possédant des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et antimicrobiennes (616). L'activité antibactérienne d'une huile essentielle est liée à la capacité de ses constituants à altérer l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité (617). Les huiles essentielles ont deux types d'action, une action lente et une action rapide. Parmi les huiles essentielles à action rapide, il y a le thymol, le carvacrol et le géraniol. Ces huiles essentielles inactivent la croissance d'*E. coli* en cinq minutes (618).

Omonijo et al. (2018) (619) ont examiné le potentiel des huiles essentielles en tant qu'alternatives aux antibiotiques dans l'industrie porcine. Il s'est avéré que ces huiles essentielles inhibent la croissance des bactéries commensales et pathogènes présentes dans les intestins de porc. Par exemple, le thymol, qui est un composé phénolique ayant une activité bactéricide importante (8). Selon de Sousa et al. (2018), l' α -pinène monoterpénique présente également une activité antibactérienne contre les souches *S. aureus* et *E. coli* (620). Au regard des résultats obtenus lors de la combinaison de la colistine avec des nanoparticules d'alginate et l'acide lactique, il apparaît que cet acide organique a une activité antibactérienne et pourrait être un élément amplificateur de l'inhibition de la croissance et de la résistance aux antibiotiques, notamment la colistine, des souches d'*E. coli*.

D'après la littérature, l'acide lactique, produit en particulier par les bactéries lactiques (420), est communément utilisé dans les aliments et les cosmétiques comme conservateur sous le code E270 (621). Il présente des activités antibactériennes contre certaines bactéries à Gram-positif telle que *L. monocytogenes* et contre des BGN telles que *E. coli* et *Sal. Enteritidis* (421, 622). En effet, il est capable d'inhiber complètement la croissance de ces microorganismes et de provoquer la fuite de leur contenus cellulaires après uniquement 6 h d'exposition (421). Cet acide est particulièrement efficace pour « déplacer » les protons à travers les membranes cellulaires, provoquant ainsi une acidification de l'environnement ou du milieu, et inhibant de fait la croissance de la cellule bactérienne (422).

L'acide citrique semble également pouvoir être utilisé dans des stratégies similaires. Il s'agit d'un acide poly-carboxylique d'origine biologique et de nature non toxique, car il est produit dans toutes les cellules vivantes (623). Son caractère antimicrobien ayant été rapporté dans des travaux récents (624, 625). Donc les acides organiques sont des molécules intéressantes à

inclure dans la conception de stratégies alternatives aux antibiotiques (626) de plus ceux-ci ne sont pas nocifs pour la santé quant ils sont utilisés aux doses adéquates (627).

Durant nos travaux, nous nous sommes intéressés également au potentiel anti-*E. coli* de certains peptides antimicrobiens (PAMs), notamment des dérmaceptines issues d'amphibiens et des bactériocines produites par *Lb. paracasei* I-CNCM 5963. Selon Cooper et al. (2011), la découverte de nouveaux antibiotiques devient à l'heure actuelle un événement de plus en plus rare. Cependant, une option pour compenser cet écueil pourrait consister dans l'introduction de peptides antimicrobiens (PAMs) en tant qu'options thérapeutiques en milieu clinique (628). Les PAMs sont impliqués dans l'inhibition de la croissance et dans la destruction de plusieurs microorganismes, tels que des bactéries, des champignons, des protozoaires et d'autres parasites (532). Outre leur activité antimicrobienne, les PAMs offrent des propriétés intéressantes, comme leurs tailles relativement faibles (inférieures à 25-30 kDa), des structures amphipathiques, une nature cationique, et un faible risque d'induction de résistance microbienne (530). Historiquement, les PAMs sont appelés peptides de défense de l'hôte cationique (629), PAM anioniques (630), peptides amphipathique cationiques (631) et peptides cationiques (632). Un certain nombre d'études antérieures ont rapporté des données sur l'activité antimicrobienne de divers PAMs et ont établi que ces molécules représentent une alternative attrayante aux antibiotiques classiques (633).

Les PAMs, synthétisés par des bactéries, sont soit des bactériocines, soit des lipopeptides (536, 634). Ces molécules diffèrent par le fait que les bactériocines sont exclusivement de nature protéique, alors que les lipopeptides sont composés de deux motifs, un motif protéique et un motif peptidique. D'autre part les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique, alors que les lipopeptides sont synthétisés par voie non-ribosomique.

Les bactériocines représentent une source de composés inexplorés potentiellement capables de limiter voire d'éliminer les bactéries pathogènes, y compris celles qui sont résistantes aux antibiotiques. Selon le système de classification le plus récent (635, 636), les bactériocines peuvent être divisées en bactériocines issues de BGN et BGP. Par ailleurs, la classification actuelle des bactériocines est basée sur leurs propriétés structurelles et physico-chimiques. Selon ces critères elles peuvent être divisées en trois classes (les lantibiotiques thermostables, les bactériocines thermostables et les bactériocines thermolabiles) (637). Enfin, les bactériocines suivent les cinétiques de production des métabolites primaires et sont produites le plus souvent en phase de croissance, les lipopeptides, quant à eux, sont synthétisés

tardivement en phase stationnaire, et sont considérés comme des métabolites secondaires (530).

Les bactériocines produites par des BGN proviennent principalement d'Enterobacteriaceae. Elles se répartissent en deux familles principales: les protéines modulaires de masse moléculaire élevée (30 à 80 kDa), appelées colicines, et les peptides de faible masse moléculaire (entre 1 et 10 kDa), appelés microcines (638). Alors que les bactériocines produites par les BGP ont en plus de leurs activités antibiotiques, des activités biologiques nouvelles et sont dépourvues d'effets cytotoxiques (639). Elles sont dotées de fonctions antagonistes ainsi que d'attributs bénéfiques supplémentaires et sont donc de ce fait considérées comme des molécules multifonctionnelles (536, 640). Ces bactériocines agissent généralement sur les cellules cibles en perturbant l'intégrité de la membrane (*via* une interaction avec une membrane cellulaire chargée négativement). Certaines agissent en inhibant la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN ou en interagissant avec certaines cibles intracellulaires (328).

Selon l'étude de Lagha et al. (2017), les bactériocines, qui sont des peptides bactéricides ou bactériostatiques, ont également un potentiel comme alternative aux agents antimicrobiens classiques en production animale (641). Souvent les bactériocines ne sont efficaces que contre une classe de micro-organismes (642). Par exemple, la pédiocine, une bactériocine produite par *Pediococcus acidilactici* PA-1 inhibe particulièrement des BGP, essentiellement appartenant au genre *L. monocytogenes* (643). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques et présentant une activité contre des souches phylogénétiquement distantes sont rares. Elles ont été mises en évidence notamment par Svetoch et al. (644) et Messaoudi et al. (645) qui ont caractérisé des bactériocines à large spectre d'activité notamment contre des BGN comme *E. coli* et *Campylobacter jejuni*, produites par des souches de *Lb. salivarius* SMXD51 (645) et *Ent. faecalis* E760 (E50-52) (644, 646). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques (BL) sont intrinsèquement tolérantes aux stress thermiques élevés et sont connues pour leur activité sur une large gamme de pH (647).

Quoi qu'il en soit les bactériocines sont de plus en plus considérées comme une nouvelle vague de molécules antibiotiques utilisables pour la prévention et le traitement des infections, ayant des activités *in vitro* et *in vivo* intéressantes (648-650). En effet, elles peuvent inhiber des bactéries pathogènes pour les animaux, telles que les *E. coli* productrices de shigatoxines (STEC), *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) et (SARM) (328, 651). Différentes études ont

rapporté l'effet cytotoxique des bactériocines et des peptides antimicrobiens (PAM) appartenant à différentes classes. Ainsi la microcine E492 (bactériocine de faible masse moléculaire de 7887 Da), produite par une souche de *K. pneumoniae* RYC 492 présente un effet toxique sur les cellules HeLa (adénocarcinome cervical humain), et sur les cellules colorectales (cellules de carcinome) à une concentration de $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mais n'a aucun effet sur les cellules de la moelle osseuse normale et les cellules d'amygdale humaine (652). Par ailleurs, la pédiocine (bactériocine PA-1/AcH produite par *Ped. acidilactici* K2a2-3, de poids moléculaire 4,6 KDa) a également un effet cytotoxique sur les cellules HeLa, HT-29 et l'adénocarcinome du côlon humain (653).

Paiva et al. (2012) ont démontré que la nisine, de 34 acides aminés, et de poids moléculaire de 2-4 KDa, a un effet cytotoxique sur les lignées cellulaires d'adénocarcinome du sein humain (MCF-7) à une concentration de $105.46 \mu\text{M}$ (654). Par ailleurs, Maher et al. (2006) ont mis en évidence la cytotoxicité de la nisine sur les deux lignées cellulaires de l'adénocarcinome humain du colon et du colorectal, HT-29 et Caco-2. Les valeurs CI_{50} rapportées étaient respectivement de $89,9 \mu\text{M}$ et $115 \mu\text{M}$ (655).

Une autre bactériocine, produite par *Lb. Sakei* GM3, isolée à partir de lait de chèvre, a montré un effet cytotoxique sur la lignée cellulaire HT-29 avec un pourcentage d'altération de $45,60 \pm 0,5\%$ à une concentration de 2 240 unités arbitraires/mL (UA/mL) (656).

La cytotoxicité de la bactériocine en général et son aptitude à cibler de manière différenciée les cellules cancéreuses peuvent dépendre de ses propriétés structurales telles que le nombre d'acides aminés chargés positivement, l'hydrophobie et son aptitude à former des structures amphipathiques ou une oligomérisation à l'instar des autres PAMs (657).

Selon Zaho et al. (2005), la membrane cellulaire semble être la cible principale des bactériocines dans les cellules eucaryotes. Ainsi l'expression accrue de molécules de surface cellulaire chargées négativement sur les cellules cancéreuses les rend plus sensibles à l'activité cytotoxique des bactériocines (658). Ainsi, les bactériocines à elles seules peuvent être utilisées dans des applications cliniques. Cependant, une autre option thérapeutique dans le cadre d'infections systémiques consiste à combiner les bactériocines avec d'autres antibiotiques ou des agents antimicrobiens existants (les huiles essentielles, les acides organiques). Cursino et al. (2006) ont démontré que les bactériocines possédaient la capacité d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes y compris *Enterobacter*, *Escherichia* (659).

Discussion générale

Au vu de tous les résultats obtenus, les approches combinatoires associant des antibiotiques avec des bactériocines et des nanoparticules et diverses molécules peuvent représenter des alternatives thérapeutiques intéressantes, améliorant le potentiel inhibiteur et la lutte contre l'antibiorésistance et peuvent élargir le spectre des antimicrobiens et entraîner une réduction de la concentration d'un antibiotique nécessaire à l'efficacité des traitements, dans la mesure où des effets secondaires potentiellement toxiques ou indésirables peuvent être réduits ou éliminés. Ainsi, l'association avec des huiles essentielles ou des acides organiques ont montré une activité stimulante de l'action antibactérienne des antibiotiques et des bactériocines notamment vis-à-vis des *E. coli*, résistantes à la colistine.

Solutions antibacteriennes	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% de survie	
	<i>E.coli</i> 184	IPEC-1	HT-29
NPs alginate [$500 \mu\text{g.mL}^{-1}$]	ND	100	100
Colistine [$60 \mu\text{g.mL}^{-1}$]	8	98%	99%
NPs alginate+colistine [(500;40) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (pH7)	1,25	100%	100%
NPs alginate+colistine +A.lactique [(500;40;15) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (pH7)	0,62	98%	96%
NPs alginate+colistine+menthol [(500;40;10) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (pH7)	0,31	100%	100%
NPs alginate+E20 [(500;60) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (pH5)	4	110%	79%
NPs alginate + E20 + A.lactique [(500;60;1) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (pH5)	2	92%	82%
NPs alginate+E20+menthol[(500;50;10) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (pH5)	2	112%	107%
NPs alginate+colistine+E20 [(500;30;30) $\mu\text{g.mL}^{-1}$] (pH7)	2	100%	/

PARTIE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

D'une manière générale, la lutte contre l'antibiorésistance est, depuis plus de 30 ans, un enjeu majeur de santé publique. Le développement croissant de l'antibioresistance, et la pénurie de nouvelles molécules thérapeutiques ont mené à la recherche de nouvelles molécules alternatives qui permettraient de lutter contre ce phénomène et potentialiser l'activité antimicrobienne des antibiotiques.

Notre travail a eu pour objectif de réduire la résistance bactérienne aux antibiotiques, plus particulièrement la résistance d'*E. coli* à la colistine, par des approches innovantes basées sur l'utilisation de bactériocines en association avec des nanoparticules (50-100 nm) biocompatibles et non toxiques, pour réduire de façon significative la quantité de colistine dans les élevages de porcs. La colistine est un antibiotique d'importance majeur, il est encore utilisé en médecine vétérinaire comme un antibiotique de dernier recours pour lutter contre les infections graves causées par des BGN.

Nos travaux se sont articulés sur trois axes susceptibles de fournir des combinaisons permettant de réduire la résistance d'*E. coli* à la colistine :

Le premier axe consistait à élaborer des nanoparticules d'alginate et la caractérisation de plusieurs paramètres physico-chimiques liés au procédé de fabrication de ces nanoparticules.

Le deuxième axe consistait à combiner la colistine avec des nanoparticules d'alginate et des petites molécules antimicrobiennes (huiles essentielles et acides organiques) capables d'exercer des effets synergiques aux antibiotiques.

Le dernier axe est la synthèse de nouvelles bactériocines semi-purifiées pour inhiber un panel de souches d'*E. coli*.

Les nanoparticules d'alginate synthétisées par le procédé Top-Down, ont été caractérisées en solution en mesurant leur taille moyenne et leur charge de surface par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DDL). Le diamètre moyen hydrodynamique était de 111 nm avec une charge de surface de -32 mV. Ainsi la caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB) a montré la synthèse des nanoparticules de différentes formes.

Ensuite, une association entre les nanoparticules d'alginate et la colistine a permis de potentialiser l'activité antibactérienne de la colistine, en diminuant la CMI de la colistine de 8

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ à $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec la souche 184 porteuse du gène *mcr-1*⁺, responsable de la résistance plasmidique chez *E. coli*.

Par ailleurs, l'association de la colistine avec des nanoparticules d'alginate et des polyamines (la spermine, la spermidine et la pipérazine), des huiles essentielles (menthol, carvacrol, farnésol et géraniol) et l'acide lactique, ont permis d'augmenter l'activité antibactérienne de la colistine. Ces petites molécules pourraient constituer des alternatives thérapeutiques efficaces pour limiter l'émergence de la multi-résistante bactérienne et principalement l'émergence de la bactérie *E. coli* résistante à la colistine.

Les effets des associations de la colistine avec les NPs d'alginate et des petites molécules sur la croissance de la souche *E. coli* ER184 a été évaluée par la numération des cellules sur boîtes de Pétri et par observation en microscopie électronique à transmission (MET). En outre, ces combinaisons confèrent à la colistine une meilleure conservation et une protection contre l'environnement gastro-intestinal lors de son passage dans le tractus digestif.

L'extrait peptidique E20, synthétisé par une souche de *Lb. paracasei*, a été également étudié pour son activité anti-*E. coli*, seul ou en association avec des nanoparticules d'alginate, des huiles essentielles ou des acides organiques.

L'association de l'extrait E20 avec des nanoparticules d'alginate a démontré une activité antibactérienne anti-*E. coli* digne d'intérêt. La CMI de la fraction E20 associée avec les nanoparticules d'alginate est de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ vis-à-vis de la souche 184 (*mcr-1*⁺). Par ailleurs l'association avec des huiles essentielles a montré également une potentialisation de l'activité anti-*E. coli* de l'extrait E20 avec une CMI réduite de deux fois vis-à-vis de la souche ER184. De la même manière, la combinaison de l'acide lactique et l'acide citrique avec E20 et les nanoparticules d'alginate ont permis d'atteindre une activité antibactérienne importante.

L'étude de l'effet des différentes combinaisons comportant E20 sur des cellules d'*E. coli*, par le dosage des protéines et la MET, ont révélé une fuite de contenu intracellulaire et un impact sur l'ultrastructure des cellules traitées. Les résultats des essais de cytotoxicité de ces combinaisons sur deux lignées cellulaires (HT-29 et IPEC-1) ont montré que cet extrait peptidique antibactérien n'a aucun effet cytotoxique. En outre, la combinaison entre les nanoparticules et E20, permet de protéger l'extrait E20 de l'environnement gastro-intestinal lors de son passage dans le tractus digestif.

Finalement, nous avons démontré que la combinaison des nanoparticules d'alginate avec deux autres peptides provenant d'amphibiens (DRS-B2 et HB2) permet de potentialiser l'activité anti-*E. coli* de ces peptides. La combinaison de ces peptides avec des nanoparticules d'alginate permet de diminuer la CMI, d'augmenter la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et d'augmenter l'activité antibactérienne, en jouant le rôle de vecteur protecteur.

La combinaison des nanoparticules d'alginate avec la colistine a un effet protecteur de l'activité de cet antibiotique contre les différents pH et les enzymes de tube digestif.

L'utilisation des huiles essentielles (menthol) et des acides organiques (acide lactique), à des concentrations non cytotoxiques, a amélioré l'activité antibactérienne de ces peptides en stimulant leur effet inhibiteur.

Globalement, les données recueillies dans le cadre de cette thèse, démontrent le rôle des nanoparticules d'alginate, qui sont de nature polysaccharidique et non toxiques, comme des vecteurs de transport et un moyen de protection des antibiotiques. Les données ont montré que ces nanoparticules biocompatibles permettent de potentialiser l'activité antibactérienne de la colistine contre *E. coli*. Un tel concept pourrait économiser la quantité d'antibiotique utilisée en thérapeutique et à limiter le développement de la résistance bactérienne.

Les résultats obtenus ont également montré que ces nanoparticules combinées avec des peptides et d'autres agents antimicrobiens pourraient constituer des alternatives thérapeutiques efficaces pour limiter l'émergence de la multi-résistance bactérienne et pourraient potentiellement remplacer la colistine dans le traitement des colibaciloses chez les porcelets.

Des tests in-vivo sur les porcelets ont été réalisés mais les résultats sont en cours de traitement.

Dans ce travail, nous avons contribué à diminuer la résistance des bactéries par l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique, une fois par l'acide organique et l'autre fois par le menthol.

Un des points limitants majeurs de cette étude est de déterminer le pourcentage maximum de l'extrait E20 adsorbée à la surface des nanoparticules, malgré que plusieurs essais avec l'HPLC ont été effectués pour la détermination.

A la lumière de tous ces résultats, les principales perspectives qui se dessinent et qui devraient être considérées dans le futur sont :

- L'étude de la combinaison des nanoparticules d'alginate avec d'autres antibiotiques et leur activité contre des BGP multi-résistantes.
- Identifier et caractériser les différentes bactériocines présentes de l'extrait peptidique E20.
- Identifier la séquence en acides aminés des peptides de l'extrait E20 actifs contre *E. coli*.
- Déterminer le pourcentage de chaque bactériocine adsorbée à la surface des nanoparticules d'alginate.
- Déterminer le mode d'action de ce composé peptidique contre les BGN
- Tester la fraction E20 contre les BGP.
- Effectuer des combinaisons de nanoparticules d'alginate et l'extrait E20 avec d'autres antibiotiques par exemple : Erythromycine et Kanamycine agissant contre SARM.
- Effectuer des combinaisons de nanoparticules d'alginate avec E20 et les deux peptides d'amphibiens et les tester contre les BGP.
- Effectuer des tests in-vivo sur les souris.

ANNEXE

Annexe 1 : Milieux de culture

I. Gélose nutritive**Composition :**

Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

Ph = 7,4 ± 0,2 à 25 °C.

Préparation : 12g par litre de BHI. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

II. BHI**Composition :**

Cervelle de veau	12,5g
Cœur de bœuf	5g
Peptone pancréatique de gélatine	10g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2,5 g
D(+)- Glucose	2 g

Ph = 7,4 ± 0,2 à 25 °C.

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

III. DMEM**Composition :**

L-Glutamine +4,5 g glucose + pénicilline et streptomycine + sérum de veau fœtal + tryptose phosphate + des acides aminés.

Ph = 7,5 ± 0,2 à +4°C.

Annexe 2 : Appareils

I. Broyeur à billes

Un broyeur à billes est un genre de broyage ultrafin qui est employé couramment dans la micronisation des matières alimentaires. Le broyeur à billes dépend de différents paramètres : température, taille des billes, nature des billes et la vitesse de rotation. Le broyeur planétaire à billes RETSCH (PM 100 S10), de poids net 86 kg, comprend deux bols de 50 ml et 125 ml. Il est caractérisé par ses modes de broyage différents (sec et humide), par son démarrage automatique programmable et son utilisation dans plusieurs domaines d'application.

II. Nanodrop

C'est un spectrophotomètre UV-vis à microvolume, il est couramment utilisé pour la quantification de l'ADN, de l'ARN, des protéines et d'autres macromolécules biologiques. C'est un spectrophotomètre UV-Visible compact et autonome, développé pour l'analyse de micro-volumes d'acide nucléique purifié et d'un large éventail de protéines.

III. Microbalance

La microbalance utilisée est la **Mettler-Toledo™ XPr6U** qui est extrêmement sensible, précise et avancée. Cette balance a une capacité de 6,1 grammes et une lisibilité de 0.0001 milligrammes (0.1 microgrammes, plus légère qu'une mèche de cheveux). La microbalance XPR est conçue pour peser des substances toxiques et / ou dangereuses dans un environnement protégé où les exigences de sécurité de l'utilisateur sont élevées.

IV. Bain à ultrasons

Le bain à ultrasons utilisé pour la préparation des échantillons est le BRANSON 2800 qui est laveur à ultrasons. Il est utilisé pour l'homogénéisation des échantillons, la dissolution des matières solides, la dispersion des particules et le nettoyage des appareils et instruments de laboratoire.

V. Spectrophotomètre Biotek ELx808

C'est un spectrophotomètre qui mesure l'intensité en fonction de la couleur, ou plus précisément de la longueur d'onde de la lumière. Il est utilisé pour le lecteur de microplaques de 96 puits. Ce spectrophotomètre est utilisé pour déterminer la CMI.

VI. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Dans une suspension donnée, les particules sont en mouvement constant, aléatoire, indépendamment les unes des autres (mouvements Browniens). Lorsqu'elles diffusent la lumière, certains faisceaux diffusés par des particules différentes à un instant donné peuvent s'additionner ou s'annuler (phénomènes d'interférences), conduisant ainsi à des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée totale au cours du temps. Dans la technique de DLS, ces fluctuations sont mesurées sur une période de temps donnée, par un compteur de photons. Elles sont directement liées au taux de diffusion des particules, lui-même dépendant de leur rayon hydrodynamique. Ces mesures permettent donc d'accéder directement à la taille et la charge (Potentiel zêta) des particules dans la suspension analysée.

Les instruments de DLS sont constitués de plusieurs modules en série : (1) une source laser, émettant une lumière monochrome constante de longueur d'onde égale à 250 nm, qui vient exciter l'échantillon contenu dans une cuve d'analyse ; (2) des détecteurs répartis à différents angles autour de l'échantillon, permettant de récupérer les photons diffusés par les particules qu'il contient ; (3) un analyseur d'intensité associé à une interface informatique, qui effectue le traitement du signal détecté et permet de déterminer la distribution de tailles des particules contenues dans l'échantillon. Compte tenu de la longueur d'onde du laser, cette technique est particulièrement adaptée pour l'analyse des NPs, dont les tailles attendues sont généralement inférieures à 250 nm, et qui diffusent donc la lumière dans toutes les directions, améliorant ainsi la détection et la précision de mesure sur la taille.

VII. Microscope électronique en transmission (MET)

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique en transmission (illustré sur la **figure 36**) est le suivant : un canon à électrons émet un faisceau électronique. Ces électrons sont ensuite accélérés grâce à une différence de potentiel qui selon les microscopes peut varier de 100 kV à quelques millions de Volts. Le faisceau traverse ensuite un système de condenseurs qui permet de régler l'éclairement de l'échantillon (focalisation, surfocalisation, ...). On distingue plusieurs types d'interactions entre les électrons et l'échantillon telles que l'absorption, les diffusions élastique et inélastique ou la diffraction. En microscopie électronique, lorsque l'échantillon est cristallin, c'est généralement la diffraction qui domine le contraste des images. A la sortie de l'échantillon, les électrons traversent la lentille objective du microscope qui permet de former un diagramme de diffraction dans son plan focal image et une image agrandie dans son plan image. L'image de l'objet ou la figure de diffraction peut

être projetée de façon très agrandie sur un écran ou un autre système d'observation (plaques photographiques, caméra CCD, ...) grâce à une ou plusieurs lentilles intermédiaires et une lentille projecteur. Il est ainsi possible d'observer avec un TEM l'espace direct (mode image) ou l'espace réciproque (mode diffraction).

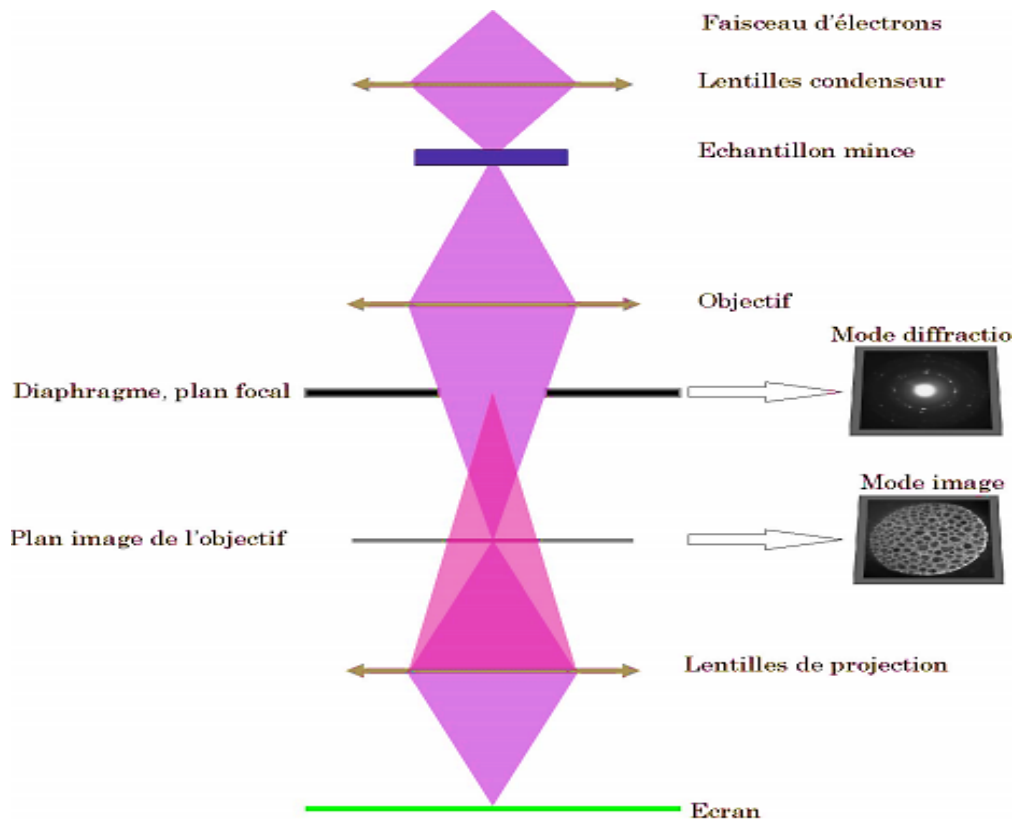


Figure 86 : Schéma de principe de fonctionnement de la microscopie électronique en transmission (660).

En microscopie électronique, les deux modes principaux d'imagerie sont les modes champ clair et champ sombre. Les contrastes observés sur les images prises dans ces deux modes sont principalement liés aux phénomènes de diffraction. Le mode champ clair consiste à former une image en n'utilisant que les électrons du faisceau direct, c'est-à-dire les électrons qui n'ont pas interagi ainsi que ceux qui, après diffraction multiple, ont la même direction de propagation que s'ils n'avaient pas interagi. Dans ce but, un diaphragme, appelé diaphragme objectif, est inséré dans le plan focal image de la lentille « objectif » et stoppe tous les faisceaux diffractés et diffusés. Dans ce mode, les zones de l'échantillon hors conditions de diffraction apparaissent claires, alors que les régions diffractant beaucoup apparaissent généralement plus sombres. De façon similaire, le diaphragme objectif peut servir à sélectionner un faisceau d'électrons diffractés, ce mode d'observation se nomme champ

sombre. Le contraste des images en champ clair ou en champ sombre est issu de la variation de l'amplitude du faisceau direct ou diffracté et provient du fait que des régions de l'objet diffractent de manière différente. C'est pourquoi ce contraste est appelé contraste de diffraction ou contraste d'amplitude.

Annexe 3 : Les courbes de la régression linéaire.

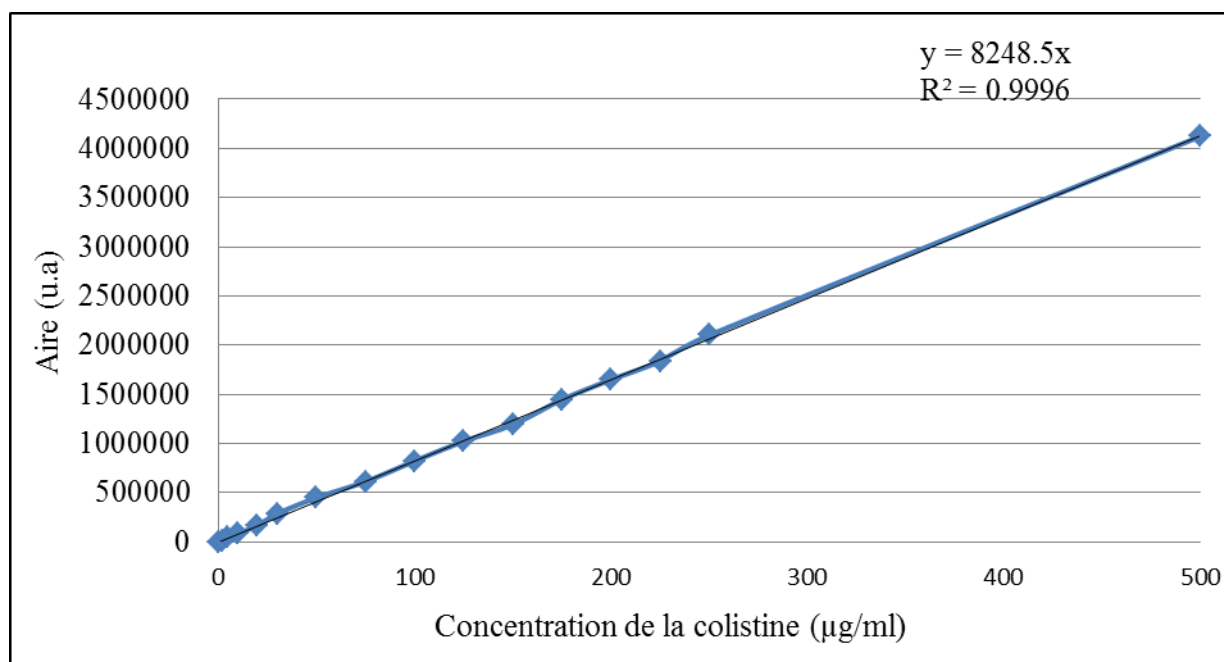


Figure 87 : Courbe d'étalonnage générée à partir des solutions standards de la colistine dissoute dans l'eau. La droite obtenue correspond à l'aire des pics de la colistine dans l'eau à 215 nm.

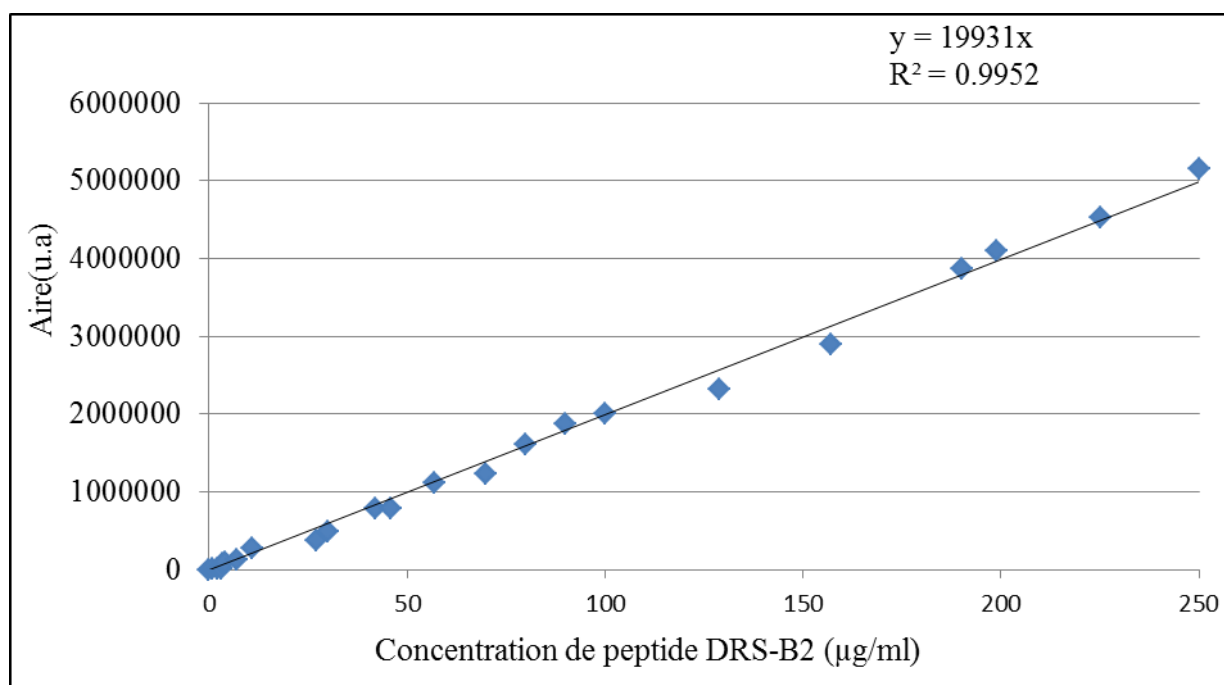


Figure 88: Courbe d'étalonnage générée à partir des solutions standards de peptide DRS-B2 dissout dans l'eau. La droite obtenue correspond à l'aire des pics de DRS-B2 dans l'eau à 215 nm.

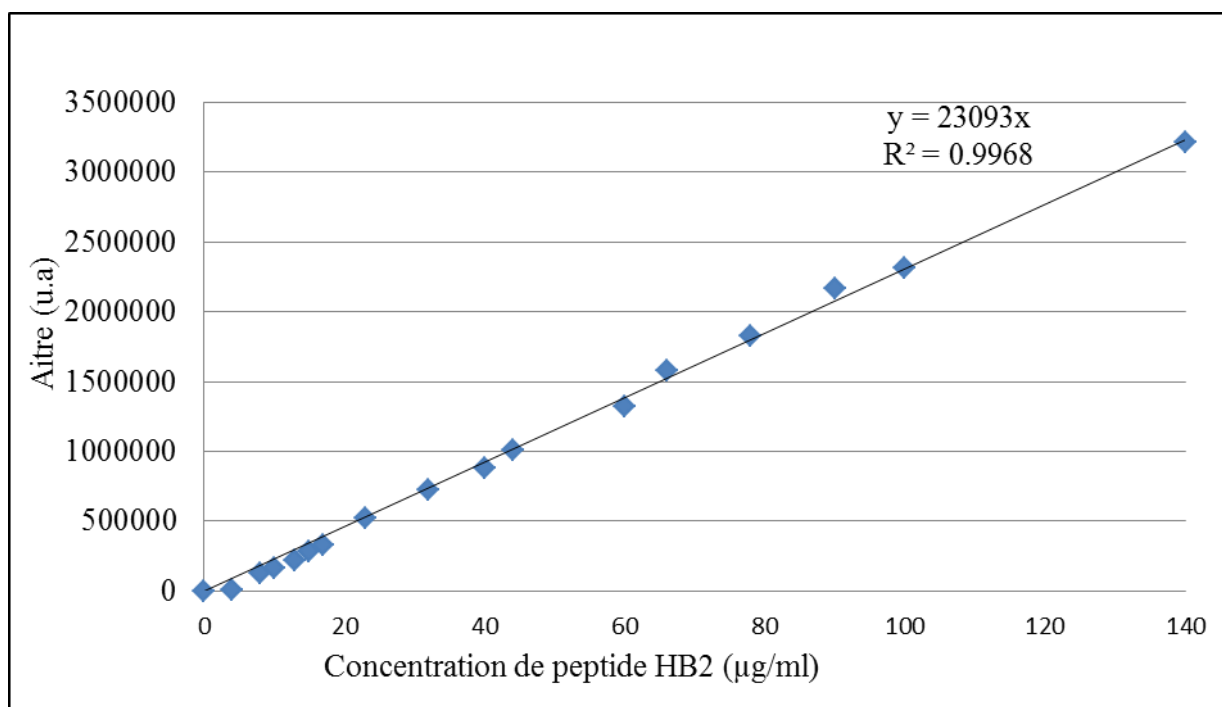
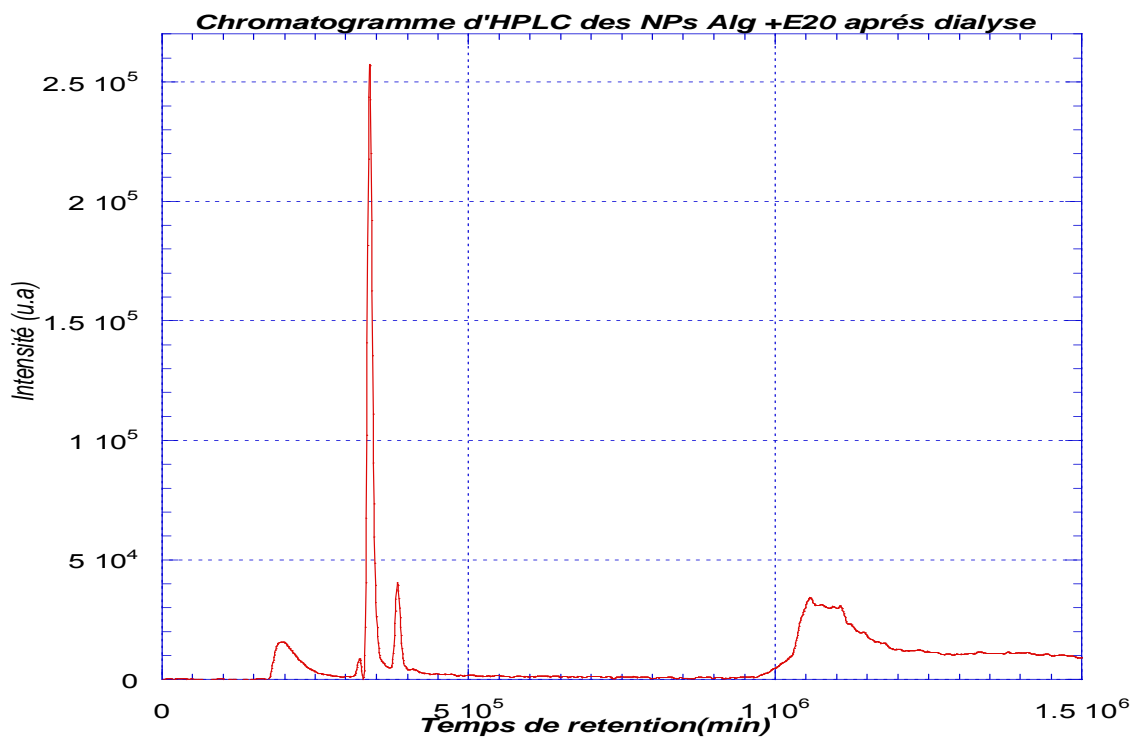
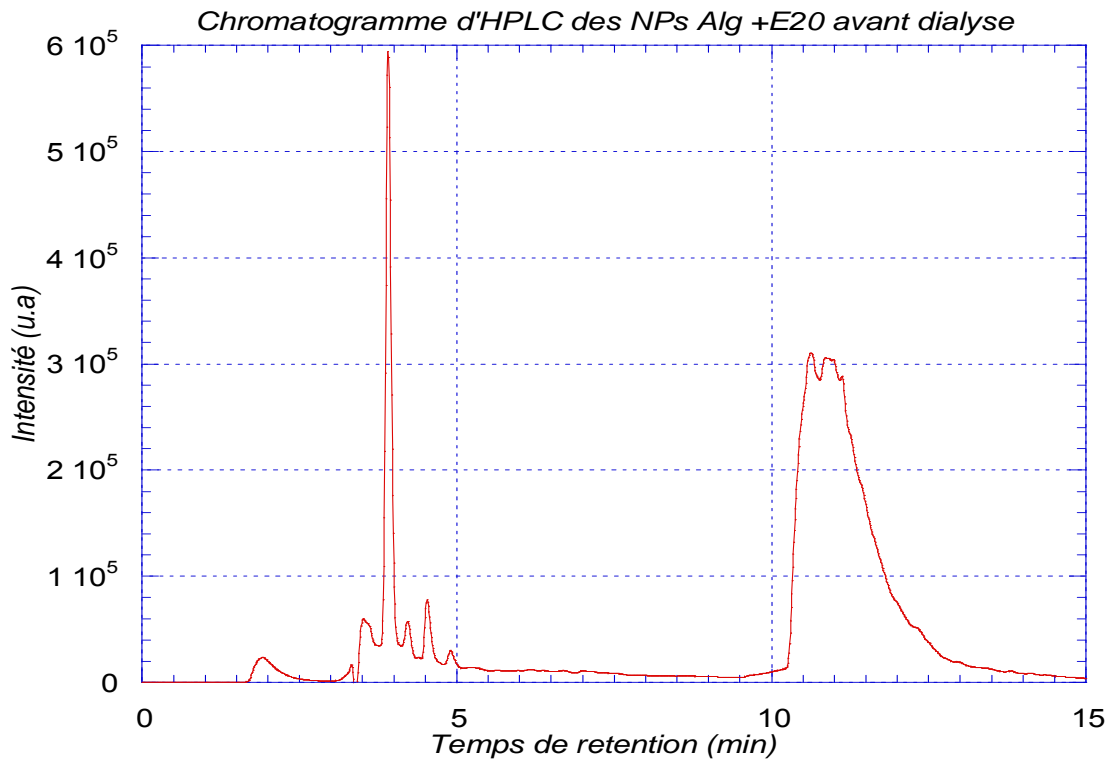


Figure 89 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir des solutions standards de peptide HB2 dissout dans l'eau. La droite obtenue correspond à l'aire des pics de HB2 dans l'eau à 215 nm.

Annexe 4 : Les chromatogrammes en HPLC de l'extrait E20



REFERENCES

1. **Luppi A.** 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag* **3**:16.
2. **Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL.** 2007. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal health research reviews* **6**:17-39.
3. **Suzuki T, Inouye H, Fujikawa K, Suketa Y.** 1963. Studies on the Chemical Structure of ColistinI. Fractionation, Molecular Weight Determination, Amino Acid and Fatty Acid Composition*. *The Journal of Biochemistry* **54**:25-33.
4. **Bergen PJ, Landersdorfer CB, Lee HJ, Li J, Nation RL.** 2012. ‘Old’ antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. *Current opinion in infectious diseases* **25**:626-633.
5. **Hémonic A, Chauvin C, Hugues L, Corrége I.** 2016. Evolution des quantités d'antibiotiques utilisées entre 2010 et 2013 dans les élevages du panel INAPORC et analyse des motifs de traitement par catégorie d'animaux. *Journal de Recherche Porcine* **48**:307-312.
6. **Hémonic A, Chauvin C, Corrége I.** 2014. Les utilisations d'antibiotiques en élevage de porcs: motifs et stratégies thérapeutiques associées. *J. Rec. Porcine* **46**:135-140.
7. **Taale E, Savadogo A, Cheikna Z, Tapsoba F, Karou SD, Traore A.** 2016. Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines Antimicrobial peptides from microbes: case of bacteriocins, vol. 10.
8. **Kalemba D, Kunicka A.** 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current medicinal chemistry* **10**:813-829.
9. **Burt S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology* **94**:223-253.
10. **Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, Winkler ME.** 2011. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. American Society for Microbiology (ASM), Washington.

11. **Diggins FW.** 1999. The true history of the discovery of penicillin, with refutation of the misinformation in the literature. *Br J Biomed Sci* **56**:83-93.
12. **Moroh J-LA.** 2013. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Université de Bretagne occidentale-Brest.
13. **Silver LL.** 2011. Challenges of antibacterial discovery. *Clinical microbiology reviews* **24**:71-109.
14. **Waksman SA.** 1973. History of the word 'Antibiotic'. *Journal of the history of medicine and allied sciences* **28**:284-286.
15. **Lansessan Ild.** Association française pour l'avancement des sciences Conférences de Paris. 18, Compte-rendu de la 18e session.
16. **Archambaud M.** 2000. Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques. Brûlures **1**.
17. **EDDAYAB.** Détection des bactéries multirésistantes au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges. Thèse de doctorat en pharmacie. Limoges : Université de Limoges, 2012, 119 p. .
18. **Shears HT.** 2006. Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences-Flammarion
19. **Flandrois J-P.** 1997. Bactériologie médicale, p. 1 vol. (309 p.), Collection Azay.
20. **Singh SBB, J. F.** 2006. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochemical pharmacology* **71**:1006-1015.
21. **Sanoficonnect**, posting date. ANTIBIO-RESPONSABLE.FR. [Online.]
22. **NAUCIEL C. VJ-L.** ., « Action des antibiotiques sur les bactéries » In Bactériologie médicale, 2ème édition. Paris : Masson, 2005, pp. 45 - 48.
23. **DEMORE B. GM, et DUVAL R.,** « Généralités sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation » In Pharmacie Clinique et Thérapeutique, 4ème édition. Paris : Elsevier Masson, 2012, pp. 801 - 844. .

24. **Van Bambeke F, Sc.** Pharmacologie et Pharmacothérapie anti-infectieuse.
25. **PHARMACOMédicale.org**, posting date. Antibiotiques : Les points essentiels [Online.]
26. **Chardon H, Brugère H.** Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes.
27. **Bêta-Lactamines PeCP, 2016.** Bêta-Lactamines, Pénicillines et Céphalosporines. Pharmacorama.
28. **Maire P, Corvaisier S, d'Yvoire MB, Claude D, Barbaut X, Carret G, Jehl F, Thalabard J-C, Jelliffe RW.** 2000, p 1-29. ESAIM: Proceedings.
29. **Frasca D, Dahyot-Fizelier C, Mimoz O.** 2008. La colistine en réanimation Colistin in the intensive care unit. *Réanimation* **17**:251-258.
30. **Roger F, Ducrot C.** 2017. Antimicrobials in agriculture: reducing their use while limiting health and socioeconomic risks in the countries of the South. *Perspective (Édition française)* N° **39**:4 p.
31. **Courvalin P, Trieu Cuot P.** 2001. Minimizing Potential Resistance: The Molecular View. *Clinical Infectious Diseases* **33**:S138-S146.
32. **Santé OOMdl** 2018, posting date. La résistance aux antibiotiques. [Online.]
33. **ANSES Agence National de sécurité sanitaire a, environnemnt, travail.** Antibiorésistance: une problématique transversal à l'ANSES
34. **Annual2016-Sandoz.** <sandoz-amr-report-2016.pdf>
<https://www.sandoz.com/sites/www.sandoz.com/files/sandoz-amr-report-2016.pdf>.
35. **Cox G, Wright GD.** 2013. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology : IJMM* **303**:287-292.
36. **Peshkova A.** 2016. Intêret de l'aromathérapie dans la lutte contre la resistance bactérienne aux antibiotiques application dans les pathologies courantes à l'officine.

37. **Martinez JL, Baquero F.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1771-1777.
38. **Davies JE.** 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Foundation symposium* **207**:15-27; discussion 27-35.
39. **Levy SB, Marshall B.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine* **10**:S122-129.
40. **Les bactéries cepaICBNcj,** <http://bionum.univ-paris-diderot.fr/2017/04/24/les-bacteries-cest-pas-automatique/> **Ds,** posting date. [Online.]
41. **Mérens A, Servonnet A.** 2010. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue Francophone des Laboratoires* **2010**:33-41.
42. **Légifrance lspdlddd** 2018 posting date. Code de la santé publique - Article R5121-152 [Online.]
43. **PREVENTION ECFD.** 2017. Summary of the latest data on antibiotic consumption in EU: 2017. ECDC
44. **Santé(ANSM) ANdSdMedpd.** 2017. Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2001et 2016
45. **Plachouras D, Kärki T, Hansen S, Hopkins S, Lyytikäinen O, Moro ML, Reilly J, Zarb P, Zingg W, Kinross P, Weist K, Monnet DL, Suetens C, Group tPPSS.** 2018. Antimicrobial use in European acute care hospitals: results from the second point prevalence survey (PPS) of healthcare-associated infections and antimicrobial use, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* **23**:1800393.
46. **EuropeanCommission.2016.** <European Commission. 2016. AMR a major European and Global challenge..pdf>
http://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_factsheet_en.pdf.
47. **Réseau B-R.** 2009. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. *Évolution* **2002**:26.

48. **InVS.** (Institut de Veille Sanitaire). L'institut. Qui sommes nous ?, 2011. Disponible sur : <http://www.invs.sante.fr/L-Institut/Qui-sommes-nous>.
49. **Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, Ovejero CM, Pati BK, Tripathi A, Singh A, Srivastava AK, Gonzalez-Zorn B.** 2014. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo-beta-lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. *International journal of antimicrobial agents* **44**:30-37.
50. **Tattevin P.** 2011. Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'acquisition communautaire. *Médecine et Maladies Infectieuses* **41**:167-175.
51. **Nour M, Mastouri M, Ben Nejma M.** 2005. Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *Pathologie Biologie* **53**:334-340.
52. **ECDC2017.** . Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) <Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016.pdf> <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>;
53. **Ambrose KD, Nisbet R, Stephens DS.** 2005. Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (mel and mef) and is erythromycin inducible. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4203-4209.
54. **Meunier O, d'Hygiène EO, Exinger J, Bactériologie Ld, Kara F.** 2016 <livret-bmr-bhre-bis (SARM,ABRI...).pdf> <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/groupe-atb/livret-bmr-bhre-bis.pdf>, Centre Hospitalier de HAGUENAU - 2016.
55. **CHAUFFREY.** Colonization et infections urinaires à entérocoque chez l'homme : analyse clinico-microbiologique de 173 patients. Thèse de doctorat en médecine. Rouen. UFR de Médecine-Pharmacie de Rouen, 2012, 125 p. .
56. **HCSP.** (Haut Conseil De Santé Publique). Rapport relatif à la maîtrise de l'émergence et de la diffusion des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) dans les établissements de santé français, mars 2010. .

57. **Singh H, Thangaraj P, Chakrabarti A.** 2013. Acinetobacter baumannii: A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current and Future Therapeutic Management. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR **7**:2602-2605.
58. **Barbier F, Wolff M.** 2010. Multirésistance chez Pseudomonas aeruginosa. Med Sci (Paris) **26**:960-968.
59. **Barbier F, Wolff M.** 2010. Multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa: towards a therapeutic dead end? Medecine sciences: M/S **26**:960-968.
60. **Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND.** 2009. Antibacterial-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clinical microbiology reviews:582-610.
61. **Melot B, Colot J, Guerrier G.** 2015. Bacteremic community-acquired infections due to Klebsiella pneumoniae: clinical and microbiological presentation in New Caledonia, 2008–2013. International Journal of Infectious Diseases **41**:29-31.
62. **Kassis-Chikhani N.** 2012. Klebsielle Pneumoniae pathogène nosocomial, résistance et virulence. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
63. **Battraud MP.** 2017 La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité ? Doctorat de pharmacie Université de Lille 2 Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille.
64. **Clemente L, Manageiro V, Jones-Dias D, Correia I, Themudo P, Albuquerque T, Geraldés M, Matos F, Almendra C, Ferreira E, Canica M.** 2015. Antimicrobial susceptibility and oxymino-beta-lactam resistance mechanisms in Salmonella enterica and Escherichia coli isolates from different animal sources. Research in microbiology **166**:574-583.
65. **Berger CN, Billker O, Meyer TF, Servin AL, Kansau I.** 2004. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering Escherichia coli (Afa/Dr DAEC). Mol Microbiol **52**:963-983.
66. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** 2004. Pathogenic Escherichia coli. Nature reviews. Microbiology **2**:123-140.

67. **Gouali M, Weill F-X.** 2013. Les Escherichia coli entérohémorragiques: des entérobactéries d'actualité. La presse Médicale **42**:68-75.
68. **Kern-Benaibout E.** 2006. Escherichia coli potentiellement pathogènes pour l'homme: synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'homme par la contamination de l'environnement.
69. **Palaniappan RU, Zhang Y, Chiu D, Torres A, Debroy C, Whittam TS, Chang YF.** 2006. Differentiation of Escherichia coli pathotypes by oligonucleotide spotted array. J Clin Microbiol **44**:1495-1501.
70. **M. Dozois C, Curtiss R.** 1999. Pathogenic diversity of Escherichia coli and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. Veterinary research **30**:157-179.
71. **Nataro JP, Kaper JB.** 1998. Diarrheagenic Escherichia coli. Clinical microbiology reviews **11**:142-201.
72. **Gyles CaJF.** 2009. Escherichia coli. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. P. J. Gyles CL, Songer JG, Thoen CO. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA: 267-308.
73. **Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G.** 2012. Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli. Gut microbes **3**:71-87.
74. Escherichia Coli, Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.
75. **Huang DB, DuPont HL.** 2004. Enteroaggregative Escherichia coli: An emerging pathogen in children. Seminars in Pediatric Infectious Diseases **15**:266-271.
76. **RESAPATH A.** 2018 Résapath, réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2017.
77. **Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL.** 2005. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Animal health research reviews **6**:17-39.
78. **Lalles JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR.** 2007. Weaning - a challenge to gut physiologists. Livestock Science **108**:82-93.

79. **Gyles CLaF, J. M. (2010). Escherichia Coli. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (eds C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer and C. O. Thoen).**
80. **AgricultureBiologique.** 2005. <LIMITER LES PERTES DE PORCELET APRES LE SEVRAGE EN ELEVAGE BIOLOGIQUE CONDUITE D'ELEVAGE.pdf>.
81. **PROHEALTH.** 2016. <SANTÉ ET BIEN-ÊTRE DES PORCS PROHEALTH.pdf>
<https://fp7-prohealth.eu/documents/33/Fiche-resume-SPACE2016-13sept-Vf.pdf>.
SPACE2016.
82. **Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandenbroucke V, Bauerfeind R, Bonilauri P, Labarque G, Hidalgo Á.** 2016. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe, p. 20, Porcine Health Manag, vol. 2.
83. **Amezcu M, M Friendship R, Dewey C, Gyles C, M Fairbrother J.** 2002. Presentation of postweaning Escherichia coli diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic E. coli serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns, vol. 66.
84. **Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A.** 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. Acta veterinaria Scandinavica **59**:31-31.
85. **Nagy B, Fekete PZ.** 2005. Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. International journal of medical microbiology : IJMM **295**:443-454.
86. **Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ, Nyachoti CM.** 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. Journal of animal physiology and animal nutrition **97**:207-237.
87. **RéussirPorc.** 2017. La vaccination Coliprotec F4/F18a réglé le problème de colibacillose en post-sevrage. Santé animale.

88. **Laine TM, Lyytikainen T, Yliaho M, Anttila M.** 2008. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Vet Scand* **50**:21.
89. **productionAnimale SFdre.** 2003. Diarrhées et maladie de l'oedème chez les porcelets sevré.
90. **Catry BC, MarcoBaptiste, Keith Grave, Kari Grein, Kornelia Holm, Anja Jukes, Helen Liebana, Ernesto Navas, Antonio Lopez Mackay, David.** 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International journal of antimicrobial agents* **46**:297-306.
91. **Katsunuma Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Hashimoto Y, Yonemochi C.** 2007. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *The Journal of general and applied microbiology* **53**:273-279.
92. **Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, Madec JY, Jouy E.** 2013. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *International journal of antimicrobial agents* **42**:379-383.
93. **Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X.** 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases* **16**:161-168.
94. **Rhouma M, Beaudry F, Theriault W, Letellier A.** 2016. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Frontiers in microbiology* **7**:1789.
95. **Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Beauchamp G, Laurent-Lewandowski S, Fairbrother JM, Letellier A.** 2016. In vivo therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate in an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *Veterinary research* **47**:58.

96. **Anjum MF, Duggett NA, AbuOun M, Randall L, Nunez-Garcia J, Ellis RJ, Rogers J, Horton R, Brena C, Williamson S.** 2016. Colistin resistance in Salmonella and Escherichia coli isolates from a pig farm in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**:2306-2313.
97. **Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Hoang HTT, Pham NT, Goossens H.** 2016. Colistin-resistant Escherichia coli harbouring mcr-1 isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:286-287.
98. **Falgenhauer L, Waezsada S-E, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, Michael GB, Schwarz S, Werner G, Kreienbrock L.** 2016. Colistin resistance gene mcr-1 in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *The Lancet infectious diseases* **16**:282-283.
99. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **40**:1333-1341.
100. **Kwa AL, Tam VH, Falagas ME.** 2008. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* **37**:870-883.
101. **Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K.** 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents* **25**:11-25.
102. **Michalopoulos A, Falagas ME.** 2008. Colistin and polymyxin B in critical care. *Critical care clinics* **24**:377-391, x.
103. **Evans ME, Feola DJ, Rapp RP.** 1999. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* **33**:960-967.
104. **He H, Li JC, Nation RL, Jacob J, Chen G, Lee HJ, Tsuji BT, Thompson PE, Roberts K, Velkov T, Li J.** 2013. Pharmacokinetics of four different brands of

- colistimethate and formed colistin in rats. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**:2311-2317.
105. **Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, Zhao M, Lee HJ, Nation RL, Li J.** 2012. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagnostic microbiology and infectious disease* **74**:213-223.
106. **Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K.** 2003. Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1364-1370.
107. **Nation RL, Velkov T, Li J.** 2014. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **59**:88-94.
108. **Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL.** 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet. Infectious diseases* **6**:589-601.
109. **Gregoire N, Aranzana-Climent V, Magreault S, Marchand S, Couet W.** 2017. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet* **56**:1441-1460.
110. **Dixon RA, Chopra I.** 1986. Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **29**:781-788.
111. **Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J.** 2010. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**:1898-1916.
112. **Peterson AA, Hancock RE, McGroarty EJ.** 1985. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **164**:1256-1261.
113. **Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, 3rd, Forrest A, Bulitta JB, Tsuji BT.** 2010. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy* **30**:1279-1291.

114. **Martis N, Leroy S, Blanc V.** 2014. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *The Journal of infection* **69**:1-12.
115. **Cajal Y, Rogers J, Berg OG, Jain MK.** 1996. Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids. *Biochemistry* **35**:299-308.
116. **Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F, Cajal Y.** 2007. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *The journal of physical chemistry. B* **111**:551-563.
117. **Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS.** 2012. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:5642-5649.
118. **Koike M, Iida K, Matsuo T.** 1969. Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin. *Journal of bacteriology* **97**:448-452.
119. **Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K.** 2001. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Colistin and Colistin Methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**:781-785.
120. **Poirel L, Jayol A, Nordmann P.** 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical microbiology reviews* **30**:557-596.
121. **Dortet L, Bonnin R, Jousset A, Gauthier L, Naas T.** 2016. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *Journal des Anti-infectieux* **18**:139-159.
122. **Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, De Frutos Escobar C, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen RS.** 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and

- mcr-5 for surveillance purposes. Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin **23**.
123. **Eiamphungporn W, Yainoy S, Jumderm C, Tan-Arsuwongkul R, Tiengrim S, Thamlikitkul V.** 2018. Prevalence of the colistin resistance gene mcr-1 in colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Thailand. *Journal of global antimicrobial resistance* **15**:32-35.
124. **EMA.** 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union development of resistance and possible impact in human and animal health
125. **Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P.** 2013. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert review of anti-infective therapy* **11**:159-177.
126. **Lu Q, Luo R, Bodin L, Yang J, Zahr N, Aubry A, Golmard JL, Rouby JJ.** 2012. Efficacy of high-dose nebulized colistin in ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Anesthesiology* **117**:1335-1347.
127. **Vardakas KZ, Voulgaris GL, Samonis G, Falagas ME.** 2018. Inhaled colistin monotherapy for respiratory tract infections in adults without cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *International journal of antimicrobial agents* **51**:1-9.
128. **Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M.** 2012. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **55**:943-950.
129. **Folgori L, Bielicki J, Heath PT, Sharland M.** 2017. Antimicrobial-resistant Gram-negative infections in neonates: burden of disease and challenges in treatment. *Current opinion in infectious diseases* **30**:281-288.

130. **Falagas ME VEaRP.** 2009 Systemic colistin use in children without cystic fibrosis: a systematic review of the literature. *International journal of antimicrobial agents. The Pediatric infectious disease journal* **33:503:501-503-513.**
131. **Ozsurekci Y, Aykac K, Cengiz AB, Bayhan C, Sancak B, Karadag Oncel E, Kara A, Ceyhan M.** 2016. Is colistin effective in the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) or extremely drug-resistant (XDR) gram-negative microorganisms in children? *Diagnostic microbiology and infectious disease* **85:233-238.**
132. **ECDC ECfdPaC.** 2017. Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union :2017.
133. **ECDC ECfDPaC.** 2018. Distribution of Other antibacterials (ATC group J01X) in the hospital sector in France, reporting year 2017.
134. **Bonten MJM.** 2006. Selective Digestive Tract Decontamination—Will It Prevent Infection with Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens but Still Be Applicable in Institutions where Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Vancomycin-Resistant Enterococci Are Endemic? *Clinical Infectious Diseases* **43:S70-S74.**
135. **Silvestri L, de la Cal MA, van Saene HK.** 2012. Selective decontamination of the digestive tract: the mechanism of action is control of gut overgrowth. *Intensive care medicine* **38:1738-1750.**
136. **EuropeanMedicinesAgency.** 2018. Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016; Trends from 2010 to 2016. *SCIENCE MEDICINES HEALTH.*
137. **ChauvinC C.** 2010. Etude des acquisitions de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques dans un échantillon d'élevages porcins naisseurs-engraisseurs année 2008 et comparaison 2008/2005, Anses.
138. **Callens B, Persoons D, Maes D, Laanen M, Postma M, Boyen F, Haesebrouck F, Butaye P, Catry B, Dewulf J.** 2012. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive veterinary medicine* **106:53-62.**

139. **Timmerman T, Dewulf J, Catry B, Feyen B, Opsomer G, de Kruif A, Maes D.** 2006. Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Preventive veterinary medicine* **74**:251-263.
140. **Fleury MA, Jouy E, Eono F, Cariolet R, Couet W, Gobin P, Le Goff O, Blanquet-Diot S, Alric M, Kempf I.** 2016. Impact of two different colistin dosing strategies on healthy piglet fecal microbiota. *Res Vet Sci* **107**:152-160.
141. **Hémonic A CC, Corrége I, Guinaudeau J, Soyer J, Berthelot N, Delzescaux D and Verliat F(2013)** Mise au point d'un outil de suivi des usages d'antibiotiques dans la filière porcine. 45e Journées de la Recherche Porcine, Paris. .
142. **ANSES.** octobre 2017 <Suivi des ventes des médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016 rapport annuel ,octobre 2017.pdf>
<https://www.anses.fr/fr/content/suivi-des-ventes-dantibiotiques-v%C3%A9t%C3%A9rinaires>
143. **Kempf I, Jouy E, Chauvin C.** 2016. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International journal of antimicrobial agents* **48**:598-606.
144. **Katsunuma Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Hashimoto Y, Yonemochi C.** 2007. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *The Journal of general and applied microbiology* **53**:273-279.
145. **EMA2015.** Avis suite à saisine formée sur le fondement de l'article 5 concernant les médicaments vétérinaires contenant de la colistine à administrer par voie orale, European Medicines Agency (EMA).
146. **Anses(2016).** Avis relatif à la saisine n°2016-SA-0160 concernant l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire., in Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail.
147. **Zavascki AP, Nation RL.** 2017. Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**.

148. **Kelesidis T, E Falagas M.** 2015. The safety of polymyxin antibiotics, vol. 14.
149. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care* **10**:R27-R27.
150. **Vardakas KZ, Falagas ME.** 2017. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. *International journal of antimicrobial agents* **49**:233-238.
151. **Fiaccadori E, Antonucci E, Morabito S, d'Avolio A, Maggiore U, Regolisti G.** 2016. Colistin Use in Patients With Reduced Kidney Function. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **68**:296-306.
152. **Ordooei Javan A, Shokouhi S, Sahraei Z.** 2015. A review on colistin nephrotoxicity. *European journal of clinical pharmacology* **71**:801-810.
153. **Pogue JM ME, Kaye KS, Marchaim D and Hayakawa K (2015).** Discordance in reported rates of nephrotoxicity associated with colistin: a systematic review to analyze the role of dose and definition, in 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Basel, Switzerland. .
154. **Phe K JM, Palmer HR and Tam VH (2014)** Validation of a model to predict the risk of nephrotoxicity in patients receiving colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**:6946-6948.
155. **Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaïou DK, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Nikita D, Michalopoulos A.** 2010. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *International journal of antimicrobial agents* **35**:194-199.
156. **Lee YJ, Wi YM, Kwon YJ, Kim SR, Chang SH, Cho S.** 2015. Association between colistin dose and development of nephrotoxicity. *Critical care medicine* **43**:1187-1193.
157. **Forrest A, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Paterson DL, Li J, Silveira FP, Nation RL.** 2017. Pharmacokinetic/Toxicodynamic Analysis

- of Colistin-Associated Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**.
158. **Horcajada JP, Sorli L, Luque S, Benito N, Segura C, Campillo N, Montero M, Esteve E, Mirelis B, Pomar V, Cuquet J, Marti C, Garro P, Grau S.** 2016. Validation of a colistin plasma concentration breakpoint as a predictor of nephrotoxicity in patients treated with colistin methanesulfonate. *International journal of antimicrobial agents* **48**:725-727.
159. **Nation RL, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Forrest A, Paterson DL, Li J, Silveira FP.** 2017. Dosing guidance for intravenous colistin in critically-ill patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **64**:565-571.
160. **Ipek MS, Aktar F, Okur N, Celik M, Ozbek E.** 2017. Colistin use in critically ill neonates: A case-control study. *Pediatrics and neonatology* **58**:490-496.
161. **Tekgunduz K, Kara M, Caner I, Demirelli Y.** 2015. Safety and Efficacy of Intravenous Colistin in Neonates With Culture Proven Sepsis, vol. 25.
162. **Alan S YD, Erdeve O, Cakir U, Kahvecioglu D, Okulu E, Ates C, Atasay B and Arsan S (2014)** Efficacy and safety of intravenous colistin in preterm infants with nosocomial sepsis caused by cinetobacter baumannii. *American journal of perinatology* 31:1079-1086. .
163. **Celebi S HM, Koksall N, Ozkan H and Çetinkaya M (2010).** Colistimethate sodium therapy for multidrug - resistant isolates in pediatric patients. *Pediatrics International* 52:410-414.
164. **Goverman J WJ, Keaney TJ and Sheridan RL (2007).** Intravenous colistin for the treatment of multi-drug resistant, gram-negative infection in the pediatric burn population. *Journal of burn care & research* 28:421-426. .
165. **Iosifidis E AC, Ioannidou M, Mitroudi M, Sdougka M, Drossou-Agakidou V, Tsivitanidou M and Roilides E (2010)** Colistin administration to pediatric and neonatal patients. *European journal of pediatrics* 169:867-874.

166. **Karbuş A ÖH, Yaman A, Kocabas BA, Ödek Ç, Güriz H, Aysev AD, Çiftçi E, Kendirli T and Ates C (2014)** The use of colistin in critically ill children in a pediatric intensive care unit. *The Pediatric infectious disease journal* 33:e19-e24.
167. **Ozsurekci Y AK, Cengiz AB, Bayhan C, Sancak B, Oncel EK, Kara A and Ceyhan M (2016)**. Is colistin effective in the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) or extremely drug-resistant (XDR) gram-negative microorganisms in children? *Diagnostic microbiology and infectious disease* 85:233-238.
168. **Paksu MS PS, Karadag A, Sensoy G, Asilioglu N, Yildizdas D, Akyildiz BN, Kendirli T, Demirkol D and Akgun M (2012)**. Old agent, new experience: colistin use in the paediatric intensive care unit—a multicentre study. *International journal of antimicrobial agents* 40:140-144. .
169. **Ozkaya-Parlakay A KAaCA**. Increased risk of nephrotoxicity: Side effect of colistin use in paediatric patients. *Int J Antimicrob Agents* 45:327.
170. **Azad MA AJ, Rogers K, Nation RL, Velkov T and Li J (2015a)**. Major pathways of polymyxin-induced apoptosis in rat kidney proximal tubular cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*
171. **Azad MA RK, Yu HH, Liu B, Schofield AV, James SA, Howard DL, Nation RL, Rogers K and de Jonge MD (2015)** Significant accumulation of polymyxin in single renal tubular cells: a medicinal chemistry and triple correlative microscopy approach. *Analytical chemistry* 87:1590-1595.
172. **Abdelraouf K BK, Yin T, Truong LD, Hu M and Tam VH (2012)**. Characterization of Polymyxin B-Induced Nephrotoxicity: Implications for Dosing Regimen Design. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56:4625-4629.
173. **Azad MAK FB, Poudyal A, Davis K, Li J, Hill PA, Nation RL, Velkov T and Li J (2013)**. Polymyxin B Induces Apoptosis in Kidney Proximal Tubular Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:4329-4335.
174. **Eadon MT HB, Alexander JJ, Xu C, Dolan ME and Cunningham PN (2013)**. Cell cycle arrest in a model of colistin nephrotoxicity. *Physiological genomics* 45:877-888.

175. **Yun B AM, Nowell CJ, Nation RL, Thompson PE, Roberts KD, Velkov T and Li J (2015)** Cellular uptake and localization of polymyxins in renal tubular cells using rationally designed fluorescent probes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59:7489-7496.
176. **Dai C LJ, Tang S, Li J and Xiao X (2014).** 2009. Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4075-4085.
177. **Nation RL LJ, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, Mouton JW, Paterson DL, Tam VH, Theuretzbacher U, Tsuji BT and Turnidge JD (2014)** Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *The Lancet Infectious Diseases*.
178. **Claus BM SS, Haerynck F, Van Daele S, De Baets F and Schelstraete P (2015).** Colistin and neurotoxicity: recommendations for optimal use in cystic fibrosis patients. *Int J Clin Pharm*:1-4.
179. **Markantonis S MN, Fousteri M, Sakellaridis N, Karatzas S, Alamanos I, Dimopoulou E and Baltopoulos G (2009).** Penetration of colistin into cerebrospinal fluid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:4907-4910.
180. **Ka Lip Chew; My-Van La; Raymond TP Lin JWT.** Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, Microscan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution.
181. **Velkov T RK, Nation RL, Thompson PE and Li J (2013).** Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future microbiology* 8:10.2217/fmb.2213.2239. .
182. **Wright MS SY, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, Kaye K, Jacobs MR, Bonomo RA and Adams MD (2015)** Genomic and Transcriptomic Analyses of Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Reveal Multiple Pathways of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59:536-543. .

183. **Macfarlane EL KA, Ochs MM and Hancock RE (1999)** PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Molecular microbiology* 34:305-316. .
184. **McPhee JB BM, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS and Hancock RE(2006.** McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS and Hancock RE(2006) Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188:3995-4006.
185. **Moskowitz SM ERaMS.** PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of bacteriology* 186:575-579. .
186. **Moskowitz SM BM, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, Selgrade SE, Miller SI, Denton M, Conway SP, Johansen HK and Høiby N (2012).** PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56:1019-1030. .
187. **Macfarlane EL KAaHR.** Macfarlane EL, Kwasnicka A and Hancock RE (2000) Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* 146:2543-2554.
188. **Jayol A NP, Brink A and Poirel L (2015)** Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrobial agents and chemotherapy: AAC*. 05055-05014. .
189. **Olaitan AO DS, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S and Paboriboune P (2014)** Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *International journal of antimicrobial agents* 44:500-507. .

190. **Macfarlane EL KAaHR.** Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* 146:2543-2554. .
191. **Olaitan AO MSaRJ.** Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology* 5:643. .
192. **Fernández L GW, Bains M, McPhee JB, Wiegand I and Hancock REW (2010).** Adaptive Resistance to the “Last Hope” Antibiotics Polymyxin B and Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by the Novel Two-Component Regulatory System ParR-ParS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54:3372-3382. .
193. **G SVaR.** 2013. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57:4449-4462.
194. **Lee J-Y CM-J, Choi HJ and Ko KS (2015).** Preservation of acquired colistin resistance in gramnegative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
195. **Yoon E MP, Lesho E, Waterman P, Clifford R, Courvalin P and Grillot-Courvalin C (2013)** Biological cost of colistin-resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, in 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany. .
196. **Beceiro A MA, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, Harper M, Boyce JD and Bou G(2014)** Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58:518-526. .
197. **Pournaras S PA, Dafopoulou K, Chabane YN, Kristo I, Makris D, Hardouin J, Cosette P, Tsakris A and Dé E (2014).** Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58:828-832. .
198. **Durante-Mangoni E DFM, Andini R, Bernardo M, Giannouli M and Zarrilli R (2015)** Emergence of colistin resistance without loss of fitness and virulence after

- prolonged colistin administration in a patient with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. .
199. **Landman D GC, Martin DA and Quale J (2008)**. Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews* 21:449-465.
 200. **Choi M-J, Ko KS**. 2015. Loss of Hypermucoviscosity and Increased Fitness Cost in Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 23 Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**:6763-6773.
 201. **Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H, Shen J**. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:161-168.
 202. **Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P**. 2016. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *The Lancet Infectious diseases* **16**:281.
 203. **Yang YQ, Li YX, Song T, Yang YX, Jiang W, Zhang AY, Guo XY, Liu BH, Wang YX, Lei CW, Xiang R, Wang HN**. 2017. Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Its Variant in *Escherichia coli* Isolates from Chickens in China. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.
 204. **Denervaud Tendon V, Poirel L, Nordmann P**. 2017. Transferability of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* **23**:813-814.
 205. **Wang Y TG-B, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, Zhou H, Lei L, Li H-Y, Doi Y, Fang Y, Ren H, Zhong L-L, Shen Z, Zeng K-J, Wang S, Liu J-H, Wu C, Walsh TR and Shen J (2017)** Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases* 17:390-399. .

206. **Haenni M MV, Gay E and Madec J-Y (2016)**. Increasing trends in mcr-1 prevalence among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from French calves despite decreasing exposure to colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60:6433-6434.
207. **Shen Z WY, Shen Y, Shen J and Wu C (2016)**. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases* 16:293.
208. **(2016) NPaPL**. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22:398-400.
209. **Pulss S ST, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R and Ewers C (2017)** First report of an *E. coli* strain from swine carrying an OXA-181-carbapenemase and colistin resistance determinant MCR-1. *International Journal of Antimicrobial Agents*. .
210. **Bi Z BB, Sun Q, Nilsson M, Chen B, Tärnberg M, Ding L, Lundborg CS, Bi Z and Tomson G (2017)**. Prevalence of the mcr-1 colistin resistance gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from human faecal samples collected in 2012 in rural villages in Shandong Province, China. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49:493-497.
211. **Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, Giani T, Menichetti F, Rossolini GM. 2016**. mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob Agents Chemother* **60**:5612-5615.
212. **Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016**. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **21**.
213. **Sun J, Xu Y, Gao R, Lin J, Wei W, Srinivas S, Li D, Yang RS, Li XP, Liao XP, Liu YH, Feng Y. 2017**. Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *mBio* **8**.

214. **Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y.** 2017. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio* **8**.
215. **Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF.** 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **22**.
216. **Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M.** 2019. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate using a combination of high-throughput, *in silico* screening and functional analysis. *bioRxiv:539361*.
217. **Kluytmans J.** 2017. Plasmid-encoded colistin resistance: *mcr-one*, two, three and counting. *Eurosurveillance* **22**:30588.
218. **Wang X, Liu Y, Qi X, Wang R, Jin L, Zhao M, Zhang Y, Wang Q, Chen H, Wang H.** 2017. Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of *mcr-negative* *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents* **50**:536-541.
219. **Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S, Rolain JM.** 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet. Infectious diseases* **16**:147.
220. **Olaitan AO, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, Morand S, Rolain JM.** 2015. Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **70**:3402-3404.
221. **Lei L, Wang Y, Schwarz S, Walsh TR, Ou Y, Wu Y, Li M, Shen Z.** 2017. *mcr-1* in Enterobacteriaceae from Companion Animals, Beijing, China, 2012-2016. *Emerging infectious diseases* **23**:710-711.

222. **Zhang XF, Doi Y, Huang X, Li HY, Zhong LL, Zeng KJ, Zhang YF, Patil S, Tian GB.** 2016. Possible Transmission of *mcr-1*-Harboring *Escherichia coli* between Companion Animals and Human. *Emerging infectious diseases* **22**:1679-1681.
223. **Skov RL, Monnet DL.** 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **21**:30155.
224. **Hu Y-Y, Wang Y-L, Sun Q-L, Huang Z-X, Wang H-Y, Zhang R, Chen G-X.** 2017. Colistin resistance gene *mcr-1* in gut flora of children. *International journal of antimicrobial agents* **50**:593-597.
225. **Trung NV, Matamoros S, Carrique-Mas JJ, Nghia NH, Nhung NT, Chieu TTB, Mai HH, van Rooijen W, Campbell J, Wagenaar JA.** 2017. Zoonotic transmission of *mcr-1* colistin resistance gene from small-scale poultry farms, Vietnam. *Emerging infectious diseases* **23**:529.
226. **Bernasconi OJ, Kuenzli E, Pires J, Tinguely R, Carattoli A, Hatz C, Perreten V.** 2016. Travelers Can Import Colistin-Resistant Enterobacteriaceae, Including Those Possessing the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene. **60**:5080-5084.
227. **Leangapichart T, Gautret P, Brouqui P, Mimish Z, Raoult D, Rolain J-M.** 2016. Acquisition of *mcr-1* Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during Hajj 2013 and 2014. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**:6998-6999.
228. **Zurfuh K, Poirel L, Nordmann P, Nuesch-Inderbinen M, Hachler H, Stephan R.** 2016. Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* **60**:2594-2595.
229. **Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B.** 2017. Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **72**:1050-1053.
230. **Liakopoulos A, Mevius DJ, Olsen B, Bonnedahl J.** 2016. The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**:2335-2336.

231. **Ruzauskas M, Vaskeviciute L.** 2016. Detection of the *mcr-1* gene in *Escherichia coli* prevalent in the migratory bird species *Larus argentatus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **71**:2333-2334.
232. **Mohsin M, Raza S, Roschanski N, Schaufler K, Guenther S.** 2016. First description of plasmid-mediated colistin-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wild migratory bird from Asia. *International journal of antimicrobial agents* **48**:463-464.
233. **Richez P, Burch DG.** 2016. Colistin in animals: a high risk for resistance selection in Europe? *The Veterinary record* **178**:101-102.
234. **Zhang R, Huang Y, Chan EW, Zhou H, Chen S.** 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet. Infectious diseases* **16**:291-292.
235. **McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, Hinkle M, Whitman T, Lesho E, Schaecher KE.** 2016. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **60**:4420-4421.
236. **Al-Tawfiq JA, Laxminarayan R, Mendelson M.** 2017. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **54**:77-84.
237. **Kuo SC, Huang WC, Wang HY, Shiau YR, Cheng MF, Lauderdale TL.** 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolates from humans and retail meats, Taiwan. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **71**:2327-2329.
238. **Rhouma M, Letellier A.** 2017. Extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases and the *mcr-1* gene: is there a historical link? *International journal of antimicrobial agents* **49**:269-271.
239. **Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, Zhou H, Lei L, Li HY, Doi Y, Fang Y, Ren H, Zhong LL, Shen Z, Zeng KJ, Wang S, Liu JH, Wu C, Walsh TR, Shen J.** 2017. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from

- China: an epidemiological and clinical study. *The Lancet. Infectious diseases* **17**:390-399.
240. **Lemoine T, Calvar C, Dubois A.** Les produits alternatifs en production porcine: état des lieux.
241. **FAO/OMS.** 2001. <Robotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.pdf> <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/fr/>.
242. **Bernardeau M, Vernoux J-P.** 2013. Overview of differences between microbial feed additives and probiotics for food regarding regulation, growth promotion effects and health properties and consequences for extrapolation of farm animal results to humans. *Clinical Microbiology and Infection* **19**:321-330.
243. **Remmal A, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Ettayebi M.** 1993. Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *Journal de pharmacie de Belgique* **48**:352-356.
244. **Huyghebaert GD, R.an Immerseel, F.** 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary journal (London, England : 1997)* **187**:182-188.
245. **VIDIC J.** 2013. Nanoparticules pour des applications antibactériennes, antifongiques et antivirales.
246. **Sahoo S, Parveen S, Panda J.** 2007. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **3**:20-31.
247. **Laurent S, Mahmoudi M.** 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics* **2**:367-390.
248. **Moore MN.** 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int* **32**:967-976.
249. **Wahajuddin, Arora S.** 2012. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International journal of nanomedicine* **7**:3445-3471.

250. **Wu W, He Q, Jiang C.** 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale research letters* **3**:397-415.
251. **Cortial AI.** 2015. Nouvelles applications des nanoparticules organiques : de la vectorisation d'un mélange d'actifs à travers la peau jusqu'au développement d'un test diagnostique in vitro de l'allergie aux parfums.
252. **Dombu Youta CL.** 2012. Mechanisms of nanoparticles delivery of proteins in airway epithelial cells. Université du Droit et de la Santé - Lille II.
253. **Lai JC, Lai MB, Jandhyam S, Dukhande VV, Bhushan A, Daniels CK, Leung SW.** 2008. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *International journal of nanomedicine* **3**:533-545.
254. **Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S.** 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **3**:168-171.
255. **Stankic S, Sternig A, Finocchi F, Bernardi J, Diwald O.** 2010. Zinc oxide scaffolds on MgO nanocubes. *Nanotechnology* **21**:355603.
256. **Taton TA.** 2002. *Nanoscale Materials in Chemistry* Edited by Kenneth J. Klabunde (Kansas State University). Wiley-Interscience: New York. 2001. xi+ 292 pp. \$99.95. ISBN: 0-471-38395-3. ACS Publications.
257. **Conlon JM, Sonnevend A.** 2010. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) **618**:3-14.
258. **Leippe M.** 1999. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Developmental and comparative immunology* **23**:267-279.
259. **Maróti G, Kereszt A, Kondorosi É, Mergaert P.** 2011. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in microbiology* **162**:363-374.

260. **Boman HG.** 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annual review of immunology **13**:61-92.
261. **Zasloff M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature **415**:389-395.
262. **Hancock RE, Diamond G.** 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends in microbiology **8**:402-410.
263. **Fassi Fehri L, Wroblewski H, Blanchard A.** 2007. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against Mycoplasma pulmonis. Antimicrob Agents Chemother **51**:468-474.
264. **B. Hadley E, E.W. Hancock R.** 2010. Strategies for the Discovery and Advancement of Novel Cationic Antimicrobial Peptides. Current Topics in Medicinal Chemistry **10**:1872-1881.
265. **Bulet P, Stocklin R, Menin L.** 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological reviews **198**:169-184.
266. **Wang G, Li X, Wang Z.** 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic acids research **37**:D933-937.
267. **Michel A-S.** 2010. A la découverte des Peptides Antimicrobiens. UHP-Université Henri Poincaré.
268. **Apponyi MA, Pukala TL, Brinkworth CS, Maselli VM, Bowie JH, Tyler MJ, Booker GW, Wallace JC, Carver JA, Separovic F, Doyle J, Llewellyn LE.** 2004. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. Peptides **25**:1035-1054.
269. **Powers JP, Hancock RE.** 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides **24**:1681-1691.
270. **Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO.** 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. Current pharmaceutical design **15**:2377-2392.

271. **Gennaro R, Zanetti M.** 2000. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**:31-49.
272. **Shai Y.** 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**:236-248.
273. **Atindehou M.** 2012. Structural and biological characterization of new natural antibacterial agents active in intestinal infections : chromogranin A-derived peptides and active molecules of *Chromolaena odorata*. Université de Strasbourg.
274. **Hancock RE, Chapple DS.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1317-1323.
275. **Devine DA.** 2003. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Molecular immunology* **40**:431-443.
276. **Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D.** 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and comparative immunology* **23**:329-344.
277. **Brogden KA.** 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology* **3**:238-250.
278. **Tossi A, Sandri L, Giangaspero A.** 2000. Amphipathic, α - helical antimicrobial peptides. *Peptide Science* **55**:4-30.
279. **Scocchi M, Tossi A, Gennaro R.** 2011. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**:2317-2330.
280. **Yu HY, Huang KC, Yip BS, Tu CH, Chen HL, Cheng HT, Cheng JW.** 2010. Rational design of tryptophan-rich antimicrobial peptides with enhanced antimicrobial activities and specificities. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **11**:2273-2282.
281. **Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J.** 1998. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* **47**:465-477.

282. **Briolat J, Wu S, Mahata S, Gonthier B, Bagnard D, Chasserot-Golaz S, Helle K, Aunis D, Metz-Boutigue M.** 2005. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **62**:377-385.
283. **Metz-Boutigue M-H, Goumon Y, Lugardon K, Strub J-M, Aunis D.** 1998. Antibacterial Peptides Are Present in Chromaffin Cell Secretory Granules. *Cellular and Molecular Neurobiology* **18**:249-266.
284. **Kieffer A-E, Goumon Y, Ruh O, Chasserot-Golaz S, Nullans G, Gasnier C, Aunis D, Metz-Boutigue M-H.** 2003. The N-and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *The FASEB Journal* **17**:776-778.
285. **Dennison SR, Howe J, Morton LH, Brandenburg K, Harris F, Phoenix DA.** 2006. Interactions of an anionic antimicrobial peptide with *Staphylococcus aureus* membranes. *Biochemical and biophysical research communications* **347**:1006-1010.
286. **Harris F, Dennison SR, Phoenix DA.** 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein and Peptide Science* **10**:585-606.
287. **Jenssen H, Hamill P, Hancock RE.** 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* **19**:491-511.
288. **Hancock RE, Sahl HG.** 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* **24**:1551-1557.
289. **Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DM, Pistolic J, Li Y, Rehaume L, Hancock RE.** 2007. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**:7684-7691.
290. **Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE.** 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**:2161-2176.

291. **Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ.** 1991. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer research* **51**:3062-3066.
292. **DOBZYNSKA I, SZACHOWICZ-PETELSKA B.** 2004. CHANGES IN ELECTRIC CHARGE AND PHOSPHOLIPIDS COMPOSITION IN ERYTHROCYTE MEMBRANE OF ETHANOL—POISONED RATS AFTER ADMINISTRATION OF TEAS. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **6**:483-487.
293. **Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA.** 1997. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *The Journal of biological chemistry* **272**:24198-24202.
294. **Chan SC, Hui L, Chen HM.** 1998. Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells. *Anticancer research* **18**:4467-4474.
295. **Horne WS, Wiethoff CM, Cui C, Wilcoxon KM, Amarin M, Ghadiri MR, Nemerow GR.** 2005. Antiviral cyclic D,L-alpha-peptides: targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorganic & medicinal chemistry* **13**:5145-5153.
296. **Robinson WE, Jr., McDougall B, Tran D, Selsted ME.** 1998. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *Journal of leukocyte biology* **63**:94-100.
297. **Belaid A, Aouni M, Khelifa R, Trabelsi A, Jemmali M, Hani K.** 2002. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of medical virology* **66**:229-234.
298. **Song BH, Lee GC, Moon MS, Cho YH, Lee CH.** 2001. Human cytomegalovirus binding to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface and/or entry stimulates the expression of human leukocyte antigen class I. *The Journal of general virology* **82**:2405-2413.
299. **Jenssen H, Andersen JH, Uhlin-Hansen L, Gutteberg TJ, Rekdal O.** 2004. Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral research* **61**:101-109.

300. **Jenssen H, Hamill P, Hancock REW.** 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews* **19**:491-511.
301. **De Lucca AJ, Walsh TJ.** 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1-11.
302. **Lee YT, Kim DH, Suh JY, Chung JH, Lee BL, Lee Y, Choi BS.** 1999. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. *Biochemistry and molecular biology international* **47**:369-376.
303. **Pushpanathan M, Rajendhran J, Jayashree S, Sundarakrishnan B, Jayachandran S, Gunasekaran P.** 2012. Identification of a novel antifungal peptide with chitin-binding property from marine metagenome. *Protein and peptide letters* **19**:1289-1296.
304. **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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**:5449-5453.
305. **Alberola J, Rodriguez A, Francino O, Roura X, Rivas L, Andreu D.** 2004. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:641-643.
306. **Park Y, Jang SH, Lee DG, Hahm KS.** 2004. Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Caenorhabditis elegans*. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **10**:304-311.
307. **Bahar AA, Ren D.** 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **6**:1543-1575.
308. **Kraus D, Peschel A.** 2006. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Current topics in microbiology and immunology* **306**:231-250.
309. **Peschel A, Sahl HG.** 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature reviews. Microbiology* **4**:529-536.

310. **Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI.** 1998. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:1829-1833.
311. **Klaenhammer TR.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:337-349.
312. **Cotter PD, Hill C, Ross RP.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews. Microbiology* **3**:777-788.
313. **Naghmouchi K, Belguesmia Y, Baah J, Teather R, Drider D.** 2011. Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in microbiology* **162**:99-107.
314. **Morency H, Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC.** 2001. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology* **47**:322-331.
315. **Frederiq P.** 1946. «Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'E.coli.» (1946): 1189-1194. *C.R Soc Biol* 140 **1189-1194**.
316. **McAuliffe O, O'Keefe T, Hill C, Ross RP.** 2001. Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR. *Molecular Microbiology* **39**:982-993.
317. **Rogers LA.** 1928. THE INHIBITING EFFECT OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* ON *LACTOBACILLUS BULGARICUS*. *Journal of bacteriology* **16**:321-325.
318. **Mattick AT, Hirsch A.** 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet (London, England)* **2**:5-8.
319. **Roberts RF, Zottola EA, McKay LL.** 1992. Use of a Nisin-Producing Starter Culture Suitable for Cheddar Cheese Manufacture¹. *Journal of Dairy Science* **75**:2353-2363.
320. **A Riley M, Wertz J.** 2002. *Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application*, vol. 56.

321. **Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S.** 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural product reports* **24**:708-734.
322. **Baquero F, Moreno F.** 1984. The microcins. *FEMS Microbiology Letters* **23**:117-124.
323. **Pons AM, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S.** 2002. New developments in non-translationally modified microcins. *Biochimie* **84**:531-537.
324. **Cascales E, Buchanan SK, Duche D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D.** 2007. Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **71**:158-229.
325. **Riley MA, Wertz JE.** 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual review of microbiology* **56**:117-137.
326. **Zacharof MP, Lovitt RW.** 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* **2**:50-56.
327. **Heng NCK, P.A Wescombe, J.P Burton, R.W Jack, et J.R Tagg.** The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. Édité par M.A Riley, & M.A Chavan. Berlin: Springer Verlag, 2007.
328. **Cotter PD, Ross RP, Hill C.** 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature reviews. Microbiology* **11**:95-105.
329. **Jasniewski J.** 2008. Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa.
330. **Papagianni M.** 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology advances* **21**:465-499.
331. **Nes IF, Yoon S-S, Diep DB.** 2007. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Biotechnology* **16**:675-690.

332. **Brotz H, Josten M, Wiedemann I, Schneider U, Gotz F, Bierbaum G, Sahl HG.** 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol* **30**:317-327.
333. **VEN FJM, HOOVEN HW, KONINGS RNH, HILBERS CW.** 1991. NMR studies of lantibiotics. *European Journal of Biochemistry* **202**:1181-1188.
334. **Ramu R, Shirahatti PS, Devi AT, Prasad A, J K, M SL, F Z, B LD, M NN.** 2015. Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation. *Critical reviews in food science and nutrition*:0.
335. **Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:85-106.
336. **Klaenhammer TR.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**:39-85.
337. **Montville TJ, Chen Y.** 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied microbiology and biotechnology* **50**:511-519.
338. **Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, Mendoza V, Hancock RE.** 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:605-614.
339. **Fernandez B.** 2014. Activité biologique et impact sur le microbiote intestinal des bactéries lactiques bactériocinogènes.
340. **Cox PA.** 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. *Ciba Foundation symposium* **185**:25-36; discussion 36-41.
341. **Labre P.** 2007. *Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminants et le cheval*. Éd. FEMENVET, Thônes (les Deux-Torrents, Av. d'Annecy, 74230).
342. **Morel J-M.** (2008) *Traité pratique de phytothérapie: Remèdes d'hier pour médecine de demain*.

343. **BRUNETON.J.** (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème ed. Ed. Tec et Doc, 1120 p.
344. **DUCROT1 C, D. FRIC2 A.-C. LALMANACH3 V. MONNET4 P. SANDERS5 CS.** 2017. Perspectives d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage<Perspectives d'alternatives thérapeutiques.pdf>
https://www6.inra.fr/productions-animales/content/download/7554/98748/version/1/file/Prod_Anim_30_1_06.pdf.
345. **BACHELET B.** 2013. Impact de la phytothérapie sur le système immunitaire. Thèse de doctorat vétérinaire, 142 pages.
346. **Chambred'agriculturedeBretagne.** 2016 Porcs-Produits-alternatifs-en-production-porcine2016.
347. **Maudsley F, Kerr KG.** 1999. Microbiological safety of essential oils used in complementary therapies and the activity of these compounds against bacterial and fungal pathogens. Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer **7**:100-102.
348. **Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR.** 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios **89**:39-46.
349. **Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R.** 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. Complementary Medicine Research **16**:79-90.
350. **Ultee A, Kets EPW, Smid EJ.** 1999. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology **65**:4606-4610.
351. **Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, Cordero C, Bicchi C.** 2010. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. Flavour and Fragrance Journal **25**:282-290.
352. **Burt S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. International journal of food microbiology **94**:223-253.

353. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.** 2008. Biological effects of essential oils--a review. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association **46**:446-475.
354. **Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS.** 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. Journal of chromatography. A **1163**:2-24.
355. **s.a. JGP.** 1997. Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz". 1997.
356. **J-M M.** Traité pratique de phytothérapie : remèdes d'hier pour médecin de demain. Éditions Jacques Grancher. Septembre 2008.
357. **F. C-M.** Juillet 2009. Huiles essentielles : l'essentiel. Conseils pratiques en aromathérapie pour toute la famille au quotidien. . Centre alsacien de reprographie..
358. **RoulierG.** Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Edt.Dangles. France, 1992.
359. **BoyleW.** 1955. Spices and essential oils as preservatives. Am. Perfurmer Essent. Oil Rev. **66**:25-28.
360. **OUSSALAH M, CAILLET S, LACROIX M.** 2006. Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection **69**:1046-1055.
361. **Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, von Wright A.** 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**:3590-3595.
362. **Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ.** 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of applied microbiology **91**:453-462.

363. **Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, Talbau A, Khouchlaa A, Charfi S, Abrini J, Dakka N.** 2017. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries.
364. **Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G.** 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2474-2478.
365. **Rhayour K.** 2002. <Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.pdf>. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz-Fès.
366. **Stein H.** FEEDING THE PIGS' IMMUNE SYSTEM AND ALTERNATIVES TO ANTIBIOTICS. *Urbana* **51**:61801.
367. **Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F.** 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary journal (London, England : 1997)* **187**:182-188.
368. **Allen HK, Levine UY, Looft T, Bandrick M, Casey TA.** 2013. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends in microbiology* **21**:114-119.
369. **Fallah R, Kiani A, Azarfar A.** 2013. A review of the role of five kinds of alternatives to in-feed antibiotics in broiler production. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* **5**:317-321.
370. **Ricke SC.** 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science* **82**:632-639.
371. **Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R.** 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* **35**:182-188.

372. **Hung CC, Garner CD, Slauch JM, Dwyer ZW, Lawhon SD, Frye JG, McClelland M, Ahmer BM, Altier C.** 2013. The intestinal fatty acid propionate inhibits Salmonella invasion through the post-translational control of HilD. *Mol Microbiol* **87**:1045-1060.
373. **Shah P, Swiatlo E.** 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **68**:4-16.
374. **Djoughri-Bouktab L, Rolain JM, Brunel JM.** 2014. Mini-review: polyamines metabolism, toxicity and potent therapeutical use. *Anti-Infective Agents* **12**:95-103.
375. **Leeuwenhoek DA.** de natise semine genitali animalculis. *Philos Trans Roy Soc* 1677; 12:1040-1043.
376. **Bachrach U.** 2010. The early history of polyamine research. *Plant physiology and biochemistry : PPB* **48**:490-495.
377. **Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C, Vane JR.** 1994. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *British journal of pharmacology* **113**:757-766.
378. **Hu J, Mahmoud MI, El-Fakahany EE.** 1994. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neuroscience letters* **175**:41-45.
379. **Wan CY, Wilkins TA.** 1993. Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. *PCR methods and applications* **3**:208-210.
380. **Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Buttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Frohlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F.** 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature cell biology* **11**:1305-1314.
381. **De Bandt JP, Moinard C, Cynober L.** 2006. Métabolisme et fonctions des polyamines. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **21**:333-341.

382. **Igarashi K, Kashiwagi K.** 2010. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant physiology and biochemistry* : PPB **48**:506-512.
383. **Armstrong D, Neu H, Peterson LR, Tomasz A.** 1995. The prospects of treatment failure in the chemotherapy of infectious diseases in the 1990s. *Microbial drug resistance* (Larchmont, N.Y.) **1**:1-4.
384. **Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ.** 2001. Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant Journal* **27**:551-560.
385. **Djoughri-Bouktab L, M. Rolain J, Brunel J.** 2014. Mini-Review: Polyamines Metabolism, Toxicity and Potent Therapeutical Use, vol. 12.
386. **Clare K.** 1993. In *Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives* (R. Whistler and J. BeMiller, eds.) pp. 105-143. Academic Press Inc.
387. **Burdick JA, Stevens MM.** 2005. 11 - Biomedical hydrogels, p. 107-115. *In* Hench LL, Jones JR (ed.), *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. Woodhead Publishing.
388. **Galanth C, Abbassi F, Lequin O, Ayala-Sanmartin J, Ladram A, Nicolas P, Amiche M.** 2009. Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain. *Biochemistry* **48**:313-327.
389. **van Zoggel H, Hamma-Kourbali Y, Galanth C, Ladram A, Nicolas P, Courty J, Amiche M, Delbe J.** 2012. Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions. *Amino acids* **42**:385-395.
390. **Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE.** 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* **3**:163-175.
391. **Oke FA, Belma Ozturk, Sahlan Altundag, Senol.** 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry* **112**:874-879.

392. **E Waymack B, L Belote J, L Baliga V, R Hajaligol M.** 2004. Effects of metal salts on char oxidation in pectins/uronic acids and other acid derivative carbohydrates, vol. 83.
393. **McHugh DJ.** 1987. Production, properties and uses of alginates. Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO. Fish. Tech. Pap **288**:58-115.
394. **Li P, Dai Y-N, Zhang J-P, Wang A-Q, Wei Q.** 2008. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. International journal of biomedical science : IJBS **4**:221-228.
395. **Dumitriu S.** 2004. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. CRC press.
396. **Lanje A, Sharma S, Pode R.** 2010. Synthesis of silver nanoparticles: A safer alternative to conventional antimicrobial and antibacterial agents, vol. 2.
397. **Gomathi T, Susi S, Abirami D, P.N S.** 2017. Size Optimization And Thermal Studies On Calcium Alginate Nanoparticles.
398. **Sartori C, Finch DS, Ralph B, Gilding K.** 1997. Determination of the cation content of alginate thin films by FTi. r. spectroscopy. Polymer **38**:43-51.
399. **BOUDERGA M.** 2015. ADSORPTION DU VERT MALACHITE PAR DES COMPOSITES «ALGINATE/BENTONITE». Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen UABT, <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/8277>.
400. **Gravereau P.** 2011. Introduction à la pratique de la diffraction des rayons X par les poudres. Sciences Chimiques, Université Bordeaux 1, France.
401. **Jana S, Trivedi M, Tallapragada RM, Branton A, Trivedi D, Nayak G, Mishra R.** 2015. Characterization of Physicochemical and Thermal Properties of Chitosan and Sodium Alginate after Biofield Treatment, vol. 6.
402. **Aprilliza M.** 2017, p 012019. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.

403. **Helmiyati H, Aprilliza M.** 2017. Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent, vol. 188.
404. **Aziz M, Ismail AF.** 2017. Chapter 5 - X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), p. 81-93. *In* Hilal N, Ismail AF, Matsuura T, Oatley-Radcliffe D (ed.), Membrane Characterization. Elsevier.
405. **Jiao C, Xiong J, Tao J, Xu S, Zhang D, Lin H, Chen Y.** 2016. Sodium alginate/graphene oxide aerogel with enhanced strength-toughness and its heavy metal adsorption study. *Int J Biol Macromol* **83**:133-141.
406. **Tong Z, Chen Y, Liu Y, Tong L, Chu J, Xiao K, Zhou Z, Dong W, Chu X.** 2017. Preparation, characterization and properties of alginate/poly (γ -glutamic acid) composite microparticles. *Marine drugs* **15**:91.
407. **Guibert Cm.** 2015. Etude des propriétés d'hyperthermie de nanoparticules dispersées dans des systèmes complexes. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
408. **Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang K-H, Kim S-K.** 2015. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International journal of biological macromolecules* **72**:269-281.
409. **Zia KM, Zia F, Zuber M, Rehman S, Ahmad MN.** 2015. Alginate based polyurethanes: A review of recent advances and perspective. *International journal of biological macromolecules* **79**:377-387.
410. **NZONG MBA M.** 2017. Analyse d'un mélange binaire par spectrophotométrie.
411. **Fujii T, Ishii A, Anpo M.** 1990. Absorption and fluorescence spectra of rhodamine B molecules encapsulated in silica gel networks and their thermal stability. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **54**:231-237.
412. **Rao H-H, Xue Z-H, Zhao G-H, Li S-Y, Du X.** 2016. Fluorescence emission properties of rhodamine B encapsulated organic-inorganic hybrid mesoporous silica host. *Journal of Non-Crystalline Solids* **450**:32-37.

413. **Wang P, Cheng M, Zhang Z.** 2014. On different photodecomposition behaviors of rhodamine B on laponite and montmorillonite clay under visible light irradiation. *Journal of Saudi Chemical Society* **18**:308-316.
414. **Inyinbor AA, Adekola FA, Olatunji GA.** 2015. Adsorption of rhodamine B dye from aqueous solution on *Irvingia gabonensis* biomass: kinetics and thermodynamics studies. *South African Journal of Chemistry* **68**:115-125.
415. **Lopez Arbeloa F, Lopez Arbeloa T, Tapia Estevez MJ, Lopez Arbeloa I.** 1991. Photophysics of rhodamines: molecular structure and solvent effects. *The Journal of Physical Chemistry* **95**:2203-2208.
416. **Herrero E, Martin del Valle E, Galán M.** 2011. Understanding the Glycoproteins Release from Alginate-Barium Capsules in Physiologic Environments, vol. 01.
417. **Tourkya B.** 2009. Mise au point de la spectroscopie de fluorescence pour la taxonomie des Pseudomonads. Application à la caractérisation d'isolats d'ateliers carnés. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne-Clermont
418. **Shah P, Swiatlo E.** 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular microbiology* **68**:4-16.
419. **Ultee A, Kets E, Smid E.** 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4606-4610.
420. **Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, Drider D.** 2019. Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Frontiers in microbiology* **10**.
421. **Wang C, Chang T, Yang H, Cui M.** 2015. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **47**:231-236.
422. **Boomsma B, Bikker E, Lansdaal E, Stuut P.** 2015. L-Lactic Acid—A Safe Antimicrobial for Home-and Personal Care Formulations. *Sofw Journal* **141**:2-5.

423. **Azzopardi EA, Boyce DE, Thomas DW, Dickson WA.** 2013. Colistin in burn intensive care: back to the future? *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **39**:7-15.
424. **Dortet L, Bonnin R, Jousset A, Gauthier L, Naas T.** 2016. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance !
425. **Pritchard MF, Powell LC, Jack AA, Powell K, Beck K, Florance H, Forton J, Rye PD, Dessen A, Hill KE, Thomas DW.** 2017. A Low-Molecular-Weight Alginate Oligosaccharide Disrupts Pseudomonal Microcolony Formation and Enhances Antibiotic Effectiveness. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **61**:e00762-00717.
426. **Powell LC, Pritchard MF, Emanuel C, Onsoyen E, Rye PD, Wright CJ, Hill KE, Thomas DW.** 2014. A nanoscale characterization of the interaction of a novel alginate oligomer with the cell surface and motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **50**:483-492.
427. **Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K.** 2005 a. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents* **25**:11-25.
428. **Ma Z, Wang J, Nation RL, Li J, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW.** 2009. Renal disposition of colistin in the isolated perfused rat kidney. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**:2857-2864.
429. **Caykara T, Demirci S.** 2006. Preparation and Characterization of Blend Films of Poly(Vinyl Alcohol) and Sodium Alginate, vol. 43.
430. **Suherman S, Audio Haryanto N, Tri Wahyuni E, Ilmi M, Morita K, Oki Y.** 2019. Carbon Dots Modification for *Escherichia coli* Detection: Variation of Colistin Sulphate Concentration, vol. 35.
431. **Murillo-Álvarez JI, Hernández-Carmona G.** 2007. Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially important seaweeds from Mexico. *Journal of applied phycology* **19**:545-548.

432. **Polyak B, Geresh S, Marks R.** 2004. Synthesis and Characterization of a Biotin-Alginate Conjugate and Its Application in a Biosensor Construction †, vol. 5.
433. **Rahmani V, Elshereef R, Sheardown H.** 2017. Optimizing electrostatic interactions for controlling the release of proteins from anionic and cationically modified alginate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **117**:232-243.
434. **Zhang P, Zhao S-R, Li J-X, Hong L, Raja MA, Yu L-J, Liu C-G.** 2016. Nanoparticles based on phenylalanine ethyl ester–alginate conjugate as vitamin B2 delivery system. *Journal of Biomaterials Applications* **31**:13-22.
435. **Stewart KK.** 1977. Thin Film Dialysis, p. 135-186. In Anfinsen CB, Edsall JT, Richards FM (ed.), *Advances in Protein Chemistry*, vol. 31. Academic Press.
436. **Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J.** 2010. Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of medicinal chemistry* **53**:1898-1916.
437. **Zahedi bialvaei A, Kafil H.** 2015. Colistin, Mechanisms and Prevalence of Resistance, vol. 31.
438. **Prof. Youri. Glupczynski DT-DDH.** 2017. Résistance à la colistine chez les bactéries à grammégatif <http://p3460.phpnet.org/nosoinfos/wp-content/uploads/2017/10/noso-XXI-03-FR.pdf>, nosoinfo, 2017 ed, vol. vol.XXI n°3 MJOÛ IRONT-ELLES
439. **Pragasam AK, Veeraraghavan B, Bakthavatchalam YD, Gopi R, Aslam RF.** 2017. Strengths and limitations of various screening methods for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae including new method recommended by clinical and laboratory standards institute, 2017: A tertiary care experience. *Indian journal of medical microbiology* **35**:116.
440. **Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2017**, https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM2019_V1.0.pdf .
441. **Al Atya AK, Abriouel H, Kempf I, Jouy E, Auclair E, Vachée A, Drider D.** 2016. Effects of colistin and bacteriocins combinations on the in vitro growth of *Escherichia coli* strains from swine origin. *Probiotics and antimicrobial proteins* **8**:183-190.

442. **Giske CG, Kahlmeter G.** 2018. Colistin antimicrobial susceptibility testing; can the slow and challenging be replaced by the rapid and convenient? *Clinical Microbiology and Infection* **24**:93-94.
443. **EUCAST.** 2016. Recommendations for MIC determination of colistin, (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf).
444. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org> ed.
445. **Olaitan AO, Morand S, Rolain JM.** 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology* **5**:643.
446. **Poirel L, Jayol A, Nordmann P.** 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes, vol. 30.
447. **Khan S, Tondervik A, Sletta H, Klinkenberg G, Emanuel C, Onsoyen E, Myrvold R, Howe RA, Walsh TR, Hill KE, Thomas DW.** 2012. Overcoming drug resistance with alginate oligosaccharides able to potentiate the action of selected antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:5134-5141.
448. **Naghmouchi K, Baah J, Hober D, Jouy E, Rubrecht C, Sane F, Drider D.** 2013. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:2719-2725.
449. **Severino P, Silveira EF, Loureiro K, Chaud MV, Antonini D, Lancellotti M, Sarmiento VH, da Silva CF, Santana MHA, Souto EB.** 2017. Antimicrobial activity of polymyxin-loaded solid lipid nanoparticles (PLX-SLN): Characterization of physicochemical properties and in vitro efficacy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **106**:177-184.

450. **Biswaro LS, da Costa Sousa MG, Rezende TMB, Dias SC, Franco OL.** 2018. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. *Frontiers in microbiology* **9**.
451. **Cerny G, Teuber M.** 1971. Differential release of periplasmic versus cytoplasmic enzymes from *Escherichia coli* B by polymyxin B. *Archiv für Mikrobiologie* **78**:166-179.
452. **Newton B.** 1953. The release of soluble constituents from washed cells of *Pseudomonas aeruginosa* by the action of polymyxin. *Microbiology* **9**:54-64.
453. **Kwon D-H, Lu C-D.** 2007. Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**:2070-2077.
454. **Vega AD, Delcour AH.** 1996. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *Journal of bacteriology* **178**:3715-3721.
455. **Kwon DH, Lu C-D.** 2006. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**:1615-1622.
456. **Samartzidou H, Delcour AH.** 1999. Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *Journal of bacteriology* **181**:791-798.
457. **Johnson L, Mulcahy H, Kanevets U, Shi Y, Lewenza S.** 2012. Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *Journal of bacteriology* **194**:813-826.
458. **Yasuda K, Ohmizo C, Katsu T.** 2004. Mode of action of novel polyamines increasing the permeability of bacterial outer membrane. *International journal of antimicrobial agents* **24**:67-71.
459. **Kwon DH, Lu C-D.** 2006. Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**:1623-1627.
460. **Vaara M, Vaara T.** 1983. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **24**:107-113.

461. **Magoulas GE, Kostopoulou ON, Garnelis T, Athanassopoulos CM, Kournoutou GG, Leotsinidis M, Dinos GP, Papaioannou D, Kalpaxis DL.** 2015. Synthesis and antimicrobial activity of chloramphenicol–polyamine conjugates. *Bioorganic & medicinal chemistry* **23**:3163-3174.
462. **Blanchet M, Borselli D, Brunel JM.** 2016. Polyamine derivatives: a revival of an old neglected scaffold to fight resistant Gram-negative bacteria? *Future medicinal chemistry* **8**:963-973.
463. **Moore KS, Wehrli S, Roder H, Rogers M, Forrest JN, McCrimmon D, Zasloff M.** 1993. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**:1354-1358.
464. **Catros-Quemener V, Chamailard L, Bouet F.** 1999. Les polyamines: rôle diagnostique et cible thérapeutique en cancérologie.
465. **Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M.** 2015. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of molecular biology* **427**:3389-3406.
466. **Til HP, Falke HE, Prinsen MK, Willems MI.** 1997. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **35**:337-348.
467. **De Billerbeck V-G.** 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* **5**:249-253.
468. **Lis - Balchin M, Hart S, Simpson E.** 2001. Buchu (*Agathosma betulina* and *A. crenulata*, rutaceae) essential oils: Their pharmacological action on guinea - pig ileum and antimicrobial activity on microorganisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**:579-582.
469. **Hassane SOS, Satrani B, Ghanmi M, Mansouri N, Mohamed H, Chaouch A.** 2011. Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle de *Plectranthus aromaticus* Roxb. de l'Ile de la Grande Comore. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **15**:251-258.

470. **Singh R, Shushni MAM, Belkheir A.** 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry* **8**:322-328.
471. **KHRIBCH J, NASSIK S, EL HOUADFI M, ZRIRA S, OUKESSOU M.** 2018. Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* **6**:300-307.
472. **FRSPH ACDFE.** 2009. Toxicology of essential oils reviewed, http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/Dweck_Toxicology_of_Essential_Oils_Review_2009.pdf. September 2009.
473. **Prashar A, Locke IC, Evans CS.** 2004. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell proliferation* **37**:221-229.
474. **Hartnoll G, Moore D, Douek D.** 1993. Near fatal ingestion of oil of cloves. *Archives of disease in childhood* **69**:392-393.
475. **Riordan M, Rylance G, Berry K.** 2002. Poisoning in children 4: household products, plants, and mushrooms. *Archives of disease in childhood* **87**:403-406.
476. **Archer CT, Kim JF, Jeong H, Park JH, Vickers CE, Lee SY, Nielsen LK.** 2011. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC genomics* **12**:9-9.
477. **Patel T, Ishiujy Y, Yosipovitch G.** 2007. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology* **57**:873-878.
478. **Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM, Lawrence BM.** 2013. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry* **96**:15-25.
479. **Schelz Z, Molnar J, Hohmann J.** 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* **77**:279-285.
480. **Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G.** 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**:2474-2478.

481. **Choi SH, Shin S.** 2007. Activity of essential oil from *Mentha piperita* against some antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains and its combination effects with antibiotics. *Natural Product Sciences* **13**:85-89.
482. **Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H.** 2001. Antibacterial activity of essential oil and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, vol. 47.
483. **Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D.** 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem* **55**:6300-6308.
484. **Ettayebi K, El Yamani J, Rossi-Hassani B.** 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **183**:191-195.
485. **Nostro A, Papalia T.** 2012. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery* **7**:28-35.
486. **Chi H, Holo H.** 2018. Synergistic Antimicrobial Activity Between the Broad Spectrum Bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Current microbiology* **75**:272-277.
487. **Chen W, Viljoen AM.** 2010. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany* **76**:643-651.
488. **Wang Y-m, Kong L-c, Liu J, Ma H-x.** 2018. Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **7**:17.
489. **Ultee A, Kets EP, Smid EJ.** 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* **65**:4606-4610.

490. **Gill AO, Holley RA.** 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology* **108**:1-9.
491. **Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M.** 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition* **55**:304-318.
492. **Xu J, Zhou F, Ji B-P, Pei R-S, Xu N.** 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* **47**:174-179.
493. **Ultee A, Bennik M, Moezelaar R.** 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1561-1568.
494. **Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P.** 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol* **43**:149-154.
495. **Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pagès J-M, Amaral L, Bolla J-M.** 2009. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**:2209-2211.
496. **Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J.** 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett* **237**:325-331.
497. **Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirliff ME.** 2006. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1463-1469.
498. **Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH.** 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1302-1309.

499. **Brehm-Stecher BF, Johnson EA.** 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**:3357-3360.
500. **Chi H, Holo H.** 2018. Synergistic Antimicrobial Activity Between the Broad Spectrum Bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Current microbiology* **75**:272-277.
501. **Kostoulias X, Murray GL, Cerqueira GM, Kong JB, Bantun F, Mylonakis E, Khoo CA, Peleg AY.** 2015. Impact of a Cross-Kingdom Signaling Molecule of *Candida albicans* on *Acinetobacter baumannii* Physiology. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:161-167.
502. **Brehm-Stecher BF, Johnson EA.** 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3357-3360.
503. **Castellano P, Peña N, Ibarreche MP, Carduza F, Soteras T, Vignolo G.** 2018. Antilisterial efficacy of *Lactobacillus* bacteriocins and organic acids on frankfurters. Impact on sensory characteristics. *J Food Sci Technol* **55**:689-697.
504. **Koyuncu S, Andersson MG, Löfström C, Skandamis PN, Gounadaki A, Zentek J, Häggblom P.** 2013. Organic acids for control of *Salmonella* in different feed materials. *BMC veterinary research* **9**:81-81.
505. **Lajhar SA, Brownlie J, Barlow R.** 2017. Survival capabilities of *Escherichia coli* O26 isolated from cattle and clinical sources in Australia to disinfectants, acids and antimicrobials. *BMC microbiology* **17**:47-47.
506. **Molina PM, Sanz ME, A. Lucchesi PM, Padola NL, Parma AE.** 2005. Effects of acidic broth and juices on the growth and survival of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Food Microbiology* **22**:469-473.
507. **Beier RC, Poole TL, Brichta-Harhay DM, Anderson RC, Bischoff KM, Hernandez CA, Bono JL, Arthur TM, Nagaraja TG, Crippen TL, Sheffield CL, Nisbet DJ.** 2013. Disinfectant and antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli*

- O157:H7 strains from cattle carcasses, feces, and hides and ground beef from the United States. *J Food Prot* **76**:6-17.
508. **Mani-López E, García HS, López-Malo A.** 2012. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International* **45**:713-721.
509. **Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R.** 2006. The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology* **35**:182-188.
510. **Kashket ER.** 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews* **3**:233-244.
511. **Hsiao C-P, Siebert KJ.** 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International journal of food microbiology* **47**:189-201.
512. **SOILLEUX M.** 2007. DCEM1 cm antibioti poly réel (ANTIBIOTIQUES); <http://andre.ar.free.fr/antibiotiques.pdf>.
513. **BACTERIOWEB D-Ag-.** Généralités sur les antibiotiques; http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours_dcem1/antibiotiques_gen.htm.
514. **Renard L, Gicquel M, Laurentie M, Sanders P.** 1996. Effet bactéricide de la colistine vis-à-vis d'Escherichia coli. Modélisation et simulation de la relation pharmacocinétique-pharmacodynamique pour la prédiction de l'efficacité en antibiothérapie vétérinaire. *Veterinary research* **27**:23-32.
515. **Chen C-CH, Feingold DS.** 1972. Locus of Divalent Cation Inhibition of the Bactericidal Action of Polymyxin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2**:331-335.
516. **O'Driscoll NH, Cushnie TPT, Matthews KH, Lamb AJ.** 2018. Colistin causes profound morphological alteration but minimal cytoplasmic membrane perforation in populations of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *Archives of Microbiology* **200**:793-802.

517. **Mohamed YF, Abou-Shleib HM, Khalil AM, El-Guink NM, El-Nakeeb MA.** 2016. Membrane permeabilization of colistin toward pan-drug resistant Gram-negative isolates. *Brazilian Journal of Microbiology* **47**:381-388.
518. **Friedman M, Henika PR, Mandrell RE.** 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot* **65**:1545-1560.
519. **Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G.** 2008. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol* **47**:167-173.
520. **Newton B.** 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological reviews* **20**:14.
521. **Koike M, Iida K, Matsuo T.** 1969. Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin. *Journal of bacteriology* **97**:448.
522. **Kaye JJ, Chapman GB.** 1963. CYTOLOGICAL ASPECTS OF ANTIMICROBIAL ANTIBIOSIS III.: Cytologically Distinguishable Stages in Antibiotic Action of Colistin Sulfate on *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **86**:536-543.
523. **Chapman GB.** 1962. Cytological aspects of antimicrobial antibiosis. I. Cytological changes associated with the exposure of *Escherichia coli* to colistin sulfate. *Journal of bacteriology* **84**:169-179.
524. **Milne MD, Scribner BH, Crawford MA.** 1958. Non-ionic diffusion and the excretion of weak acids and bases. *The American journal of medicine* **24**:709-729.
525. **Burian A, Erdogan Z, Jandrisits C, Zeitlinger M.** 2012. Impact of pH on Activity of Trimethoprim, Fosfomycin, Amikacin, Colistin and Ertapenem in Human Urine. *Pharmacology* **90**:281-287.
526. **Zhong R, Xia J, Sun H, Qin G.** 2017. Effects of different sources of protein on the growth performance, blood chemistry and polypeptide profiles in the gastrointestinal

- tract digesta of newly weaned piglets. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **101**:e312-e322.
527. **Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Laurent-Lewandowski S, Fairbrother JM, Letellier A.** 2015. Gastric stability and oral bioavailability of colistin sulfate in pigs challenged or not with *Escherichia coli* O149: F4 (K88). *Res Vet Sci* **102**:173-181.
528. **Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD.** 2005. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* **40**:1333-1341.
529. **Coppi G, Sala N, Bondi M, Sergi S, Iannuccelli V.** 2006. Ex-vivo evaluation of alginate microparticles for Polymyxin B oral administration. *Journal of drug targeting* **14**:599-606.
530. **Drider D, Rebuffat S.** 2011. Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Springer Science & Business Media.
531. **Rea MC, Ross RP, Cotter PD, Hill C.** 2011. Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria, p. 29-53. *In* Drider D, Rebuffat S (ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer New York, New York, NY.
532. **Coutinho HDM, Lôbo KM, Bezerra DAC, Lôbo I.** 2008. Peptides and proteins with antimicrobial activity. *Indian journal of pharmacology* **40**:3-9.
533. **Nes IF.** 2011. History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria, p. 3-12, *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Springer.
534. **Svetoch E, Eruslanov B, Kovalev Y, Mitsevich E, Mitsevich I, Levchuk V, Fursova N, Perelygin V, Stepanshin Y, Teymurasov M.** 2009. Antimicrobial activities of bacteriocins E 50–52 and B 602 against antibiotic-resistant strains involved in nosocomial infections. *Probiotics and antimicrobial proteins* **1**:136.

535. **Seal BS, Drider D, Oakley BB, Brüssow H, Bikard D, Rich JO, Miller S, Devillard E, Kwan J, Bertin G.** 2018. Microbial-derived products as potential new antimicrobials. *Veterinary research* **49**:66.
536. **Drider D, Bendali F, Naghmouchi K, Chikindas ML.** 2016. Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics and antimicrobial proteins* **8**:177-182.
537. **Bernet-Camard MF, Liévin V, Brassart D, Neeser JR, Servin AL, Hudault S.** 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Applied and environmental microbiology* **63**:2747-2753.
538. **Dutta P, Das S.** 2016. Mammalian antimicrobial peptides: promising therapeutic targets against infection and chronic inflammation. *Current topics in medicinal chemistry* **16**:99-129.
539. **Lee TH, Hall KN, Aguilar MI.** 2016. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr Top Med Chem* **16**:25-39.
540. **Cytrynska M, Zdybicka-Barabas A.** 2015. Defense peptides: recent developments. *Biomolecular concepts* **6**:237-251.
541. **Phoenix DA, Dennison SR, Harris F.** 2012. *Antimicrobial peptides*. John Wiley & Sons.
542. **Bhatia S, Bharti A.** 2015. Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *J Food Sci Technol* **52**:3504-3512.
543. **Entian K-D, de Vos WM.** 1996. Genetics of subtilin and nisin biosyntheses. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**:109-117.
544. **Yang E, Fan L, Yan J, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S, Walker B.** 2018. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express* **8**:10-10.

545. **Walkenhorst WF, Klein JW, Vo P, Wimley WC.** 2013. pH Dependence of microbe sterilization by cationic antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**:3312-3320.
546. **Zhang L-j, Gallo RL.** 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology* **26**:R14-R19.
547. **Malik E, Dennison SR, Harris F, Phoenix DA.** 2016. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **9**:67.
548. **Khan S, Tøndervik A, Sletta H, Klinkenberg G, Emanuel C, Onsøyen E, Myrvold R, Howe RA, Walsh TR, Hill KE, Thomas DW.** 2012. Overcoming drug resistance with alginate oligosaccharides able to potentiate the action of selected antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**:5134-5141.
549. **Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS.** 2010. Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:3132-3142.
550. **Li A, Lee P, Ho B, Ding J, Lim C.** 2007. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1768**:411-418.
551. **Meincken M, Holroyd D, Rautenbach M.** 2005. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**:4085-4092.
552. **Epand RM, Vogel HJ.** 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1462**:11-28.
553. **Pag U, Oedenkoven M, Sass V, Shai Y, Shamova O, Antcheva N, Tossi A, Sahl H-G.** 2008. Analysis of in vitro activities and modes of action of synthetic antimicrobial peptides derived from an α -helical 'sequence template'. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **61**:341-352.

554. **Abdelraouf K, Braggs KH, Yin T, Truong LD, Hu M, Tam VH.** 2012. Characterization of polymyxin B-induced nephrotoxicity: implications for dosing regimen design. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**:4625-4629.
555. **Zarrini G, Delgosha ZB, Moghaddam KM, Shahverdi AR.** 2010. Post-antibacterial effect of thymol. *Pharmaceutical biology* **48**:633-636.
556. **Karapinar M, Esen Aktuğ Ş.** 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International journal of food microbiology* **4**:161-166.
557. **Friedman M, Henika PR, Mandrell RE.** 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of food protection* **65**:1545-1560.
558. **Braga PC.** 2005. Thymol: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. *Giornale italiano di ostetricia e ginecologia* **27**:267-272.
559. **Periago P, Palop A, Fernandez P.** 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science and Technology International* **7**:487-492.
560. **Turgis M.** 2012. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food research international* **v. 48**:pp. 696-702-2012 v.2048 no.2012.
561. **LeBel G, Vaillancourt K, Bercier P, Grenier D.** 2019. Antibacterial activity against porcine respiratory bacterial pathogens and in vitro biocompatibility of essential oils. *Archives of Microbiology*.
562. **Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N.** 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food microbiology* **25**:120-127.
563. **Campion A, Morrissey R, Field D, Cotter PD, Hill C, Ross RP.** 2017. Use of enhanced nisin derivatives in combination with food-grade oils or citric acid to control

- Cronobacter sakazakii and Escherichia coli O157: H7. Food microbiology **65**:254-263.
564. **Field D, Daly K, O'Connor PM, Cotter PD, Hill C, Ross RP.** 2015. Efficacies of nisin A and nisin V semipurified preparations alone and in combination with plant essential oils for controlling *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol **81**:2762-2769.
565. **Field D, Baghou I, Rea MC, Gardiner GE, Ross RP, Hill C.** 2017. Nisin in Combination with Cinnamaldehyde and EDTA to Control Growth of *Escherichia coli* Strains of Swine Origin. Antibiotics **6**:35.
566. **Smith MK, Draper LA, Hazelhoff PJ, Cotter PD, Ross RP, Hill C.** 2016. A Bioengineered Nisin Derivative, M21A, in Combination with Food Grade Additives Eradicates Biofilms of *Listeria monocytogenes*. Frontiers in microbiology **7**:1939.
567. **In Y-W, Kim J-J, Kim H-J, Oh S-W.** 2013. Antimicrobial Activities of Acetic Acid, Citric Acid and Lactic Acid against *Shigella* Species. Journal of Food Safety **33**:79-85.
568. **Long S, Xu Y, Pan L, Wang Q, Wang C, Wu J, Wu Y, Han Y, Yun C, Piao X.** 2018. Mixed organic acids as antibiotic substitutes improve performance, serum immunity, intestinal morphology and microbiota for weaned piglets. Animal feed science and technology **235**:23-32.
569. **Kang J, Stasiewicz MJ, Murray D, Boor KJ, Wiedmann M, Bergholz TM.** 2014. Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. International journal of food microbiology **179**:1-9.
570. **Zhao X, Zhen Z, Wang X, Guo N.** 2017. Synergy of a combination of nisin and citric acid against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Additives & Contaminants: Part A **34**:2058-2068.
571. **Bollenbach T.** 2015. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. Current opinion in microbiology **27**:1-9.

572. **Belguesmia Y, Madi A, Sperandio D, Merieau A, Feuilloley M, Prévost H, Drider D, Connil N.** 2011. Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37. *Research in microbiology* **162**:159-163.
573. **Naghmouchi K, Drider D, Baah J, Teather R.** 2010. Nisin A and polymyxin B as synergistic inhibitors of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins* **2**:98-103.
574. **Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP.** 2017. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Frontiers in microbiology* **8**.
575. **Abdelraouf K, Braggs KH, Yin T, Truong LD, Hu M, Tam VH.** 2012. Characterization of polymyxin B-induced nephrotoxicity: implications for dosing regimen design. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:4625-4629.
576. **Al Atya AK, Abriouel H, Kempf I, Jouy E, Auclair E, Vachee A, Drider D.** 2016. Effects of Colistin and Bacteriocins Combinations on the In Vitro Growth of *Escherichia coli* Strains from Swine Origin. *Probiotics Antimicrob Proteins* **8**:183-190.
577. **Castro M, Palavecino N, Herman C, Garro O, Campos C.** 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat science* **87**:321-329.
578. **Joshi VK, Sharma S, Rana NS.** 2006. Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology* **44**:435-439.
579. **Lv X, Lin Y, Jie Y, Sun M, Zhang B, Bai F, Zhao H, Li J.** 2018. Purification, characterization, and action mechanism of plantaricin DL3, a novel bacteriocin against *Pseudomonas aeruginosa* produced by *Lactobacillus plantarum* DL3 from Chinese Suan-Tsai. *European Food Research and Technology* **244**:323-331.
580. **Hu M, Zhao H, Zhang C, Yu J, Lu Z.** 2013. Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated

- from traditional Chinese fermented vegetables. Journal of agricultural and food chemistry **61**:11676-11682.
581. **Magnusson J, Schnürer J.** 2001. Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl. Environ. Microbiol. **67**:1-5.
582. **Svetoch EA, Eruslanov BV, Levchuk VP, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Stepanshin J, Dyatlov I, Seal BS, Stern NJ.** 2011. Isolation of Lactobacillus salivarius 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. Applied and environmental microbiology **77**:2749-2754.
583. **Sharma G, Dang S, Gupta S, Gabrani R.** 2018. Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and the Mechanism of Action of Bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101. Medical Principles and Practice **27**:186-192.
584. **Smitha S, Bhat SG.** 2013. Thermostable Bacteriocin BL8 from Bacillus licheniformis isolated from marine sediment. Journal of applied microbiology **114**:688-694.
585. **Aspri M, O'Connor PM, Field D, Cotter PD, Ross P, Hill C, Papademas P.** 2017. Application of bacteriocin-producing Enterococcus faecium isolated from donkey milk, in the bio-control of Listeria monocytogenes in fresh whey cheese. International Dairy Journal **73**:1-9.
586. **Chen Y-S, Wu H-C, Yu C-R, Chen Z-Y, Lu Y-C, Yanagida F.** 2016. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from xi-gua-mian (fermented watermelon), a traditional fermented food in Taiwan. Italian Journal of Food Science **28**:9-14.
587. **Xi Q, Wang J, Du R, Zhao F, Han Y, Zhou Z.** 2018. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by a Strain of Enterococcus faecalis TG2. **184**:1106-1119.
588. **Abanoz HS, Kunduhoglu B.** 2018. Antimicrobial Activity of a Bacteriocin Produced by Enterococcus faecalis KT11 against Some Pathogens and Antibiotic-Resistant Bacteria. Korean journal for food science of animal resources **38**:1064-1079.

589. **ISLEROGLU H, YILDIRIM Z, TOKATLI M, ONCUL N, YILDIRIM M.** 2012. Partial characterisation of enterocin KP produced by *Enterococcus faecalis* KP, a cheese isolate. *International Journal of Dairy Technology* **65**:90-97.
590. **Du Toit E, Rautenbach M.** 2000. A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of microbiological methods* **42**:159-165.
591. **Amiche M, Ducancel F, Lajeunesse E, Boulain JC, Menez A, Nicolas P.** 1993. Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of adenoregulin from frog skin. Relationships with the vertebrate defensive peptides, dermaseptins. *Biochemical and biophysical research communications* **191**:983-990.
592. **Charpentier S, Amiche M, Mester J, Vouille V, Le Caer JP, Nicolas P, Delfour A.** 1998. Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. *The Journal of biological chemistry* **273**:14690-14697.
593. **Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO.** 2008. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnology and bioengineering* **99**:1140-1153.
594. **Nicolas P, El Amri C.** 2009. The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**:1537-1550.
595. **Mor A, Hani K, Nicolas P.** 1994. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* **269**:31635-31641.
596. **Galanth C.** 2009. Etude du mécanisme d'action d'une peptide cationique antibactérien, la dermaseptine B2.
597. **Patel T, Ishiujji Y, Yosipovitch G.** 2007. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology* **57**:873-878.

598. **Turcheniuk V, Raks V, Issa R, Cooper IR, Cragg PJ, Jijie R, Dumitrascu N, Mikhalovska LI, Barras A, Zaitsev V.** 2015. Antimicrobial activity of menthol modified nanodiamond particles. *Diamond and Related Materials* **57**:2-8.
599. **Genin G.** 1960. L'acide lactique et ses applications. *Le Lait* **40**:27-37.
600. **Wang P, Jiang X, Jiang Y, Hu X, Mou H, Li M, Guan H.** 2007. In vitro antioxidative activities of three marine oligosaccharides. *Natural product research* **21**:646-654.
601. **Liao S-H, Liu C-H, Bastakoti BP, Suzuki N, Chang Y, Yamauchi Y, Lin F-H, Wu KCW.** 2015. Functionalized magnetic iron oxide/alginate core-shell nanoparticles for targeting hyperthermia. *International journal of nanomedicine* **10**:3315-3327.
602. **Paques JP, van der Linden E, van Rijn CJ, Sagis LM.** 2014. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in colloid and interface science* **209**:163-171.
603. **Kouassi M-C.** 2017. Functionalization of polysaccharides by natural-origin compounds with antioxidant and antibacterial properties. Normandie Université.
604. **Dhariwal AK, Tullu MS.** 2013. Colistin: re-emergence of the 'forgotten' antimicrobial agent. *Journal of postgraduate medicine* **59**:208-215.
605. **Polyak B, Geresh S, Marks RS.** 2004. Synthesis and characterization of a biotin-alginate conjugate and its application in a biosensor construction. *Biomacromolecules* **5**:389-396.
606. **Youta CLD.** 2012. Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires: caractérisation des mécanismes impliqués. Université du Droit et de la Santé-Lille II.
607. **Nicolas J, Couvreur P.** 2017. Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux. *médecine/sciences* **33**:11-17.
608. **Murata Y, Jinno D, Liu D, Isobe T, Kofuji K, Kawashima S.** 2007. The drug release profile from calcium-induced alginate gel beads coated with an alginate hydrolysate. *Molecules (Basel, Switzerland)* **12**:2559-2566.

609. **Rojo L, Barcenilla JM, Vázquez B, González R, San Román J.** 2008. Intrinsically antibacterial materials based on polymeric derivatives of eugenol for biomedical applications. *Biomacromolecules* **9**:2530-2535.
610. **Keawchaon L, Yoksan R.** 2011. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **84**:163-171.
611. **Huang JX, Blaskovich MA, Pelingon R, Ramu S, Kavanagh A, Elliott AG, Butler MS, Montgomery AB, Cooper MA.** 2015. Mucin Binding Reduces Colistin Antimicrobial Activity. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:5925-5931.
612. **Hengzhuang W, Song Z, Ciofu O, Onsoyen E, Rye PD, Hoiby N.** 2016. OligoG CF-5/20 Disruption of Mucoïd Pseudomonas aeruginosa Biofilm in a Murine Lung Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother* **60**:2620-2626.
613. **Rosato A, Piarulli M, Corbo F, Muraglia M, Carone A, Vitali M, Vitali C.** 2010. In vitro synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current medicinal chemistry* **17**:3289-3295.
614. **Yap P, Krishnan T, Chan K-G, Lim S.** 2015. Antibacterial mode of action of Cinnamomum verum bark essential oil, alone and in combination with piperacillin, against a multi-drug-resistant Escherichia coli strain. *J. Microbiol. Biotechnol* **25**:1299-1306.
615. **Yap PSX, Yang SK, Lai KS, Lim SHE.** 2017. Essential Oils: The Ultimate Solution to Antimicrobial Resistance in Escherichia coli?, Escherichia coli-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. IntechOpen.
616. **Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore G, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo M, Ademiluyi A.** 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules* **22**:70.
617. **O'Bryan CA, Pendleton SJ, Crandall PG, Ricke SC.** 2015. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture—in vitro studies on antibacterial mode of action. *Frontiers in veterinary science* **2**:35.

618. **Chouhan S, Sharma K, Guleria S.** 2017. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel, Switzerland)* **4**:58.
619. **Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C.** 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition* **4**:126-136.
620. **De Sousa Eduardo L, Farias TC, Ferreira SB, Ferreira PB, Lima ZN, Ferreira SB.** 2018. Antibacterial Activity and Time-kill Kinetics of Positive Enantiomer of α -pinene Against Strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Current topics in medicinal chemistry* **18**:917-924.
621. **Alsaheb RAA, Aladdin A, Othman NZ, Malek RA, Leng OM, Aziz R, Enshasy H.** 2015. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *J. Chem. Pharm. Res* **7**:729-735.
622. **Shiravani Z, Aliakbarlu J, Tajik H.** 2017. Antibacterial activity of acetic and lactic acid against *Listeria monocytogenes* and their effect on the intracellular constituent release. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences* **21**:162-169.
623. **Singh N, Arya P, Tripathi PK, Negi DS.** 2018. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Two Novel Benzimidazole Compounds from Citric Acid. *Journal of Applicable Chemistry* **7**:52-58.
624. **Kim S, Rhee M-S.** 2015. Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with citric acid against both *Escherichia coli* O157: H7 and indigenous microflora in carrot juice. *Food microbiology* **49**:166-172.
625. **Olaimat AN, Al-Nabulsi AA, Osaili TM, Al-Holy M, Ayyash MM, Mehyar GF, Jaradat ZW, Ghoush MA.** 2017. Survival and inhibition of *Staphylococcus aureus* in commercial and hydrated tahini using acetic and citric acids. *Food control* **77**:179-186.
626. **Dittoe DK, Ricke SC, Kiess AS.** 2018. Organic Acids and Potential for Modifying the Avian Gastrointestinal Tract and Reducing Pathogens and Disease. *Frontiers in Veterinary Science* **5**.

627. **Wang JP, Yoo JS, Lee JH, Jang HD, Kim HJ, Shin SO, Seong SI, Kim IH.** 2009. Effects of phenyllactic acid on growth performance, nutrient digestibility, microbial shedding, and blood profile in pigs. *Journal of animal science* **87**:3235-3243.
628. **Cooper MA, Shlaes D.** 2011. Fix the antibiotics pipeline. *Nature* **472**:32.
629. **Brown KL, Hancock RE.** 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current opinion in immunology* **18**:24-30.
630. **Harris F, Dennison SR, Phoenix DA.** 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current protein & peptide science* **10**:585-606.
631. **Groenink J, Walgreen-Weterings E, van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV.** 1999. Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **179**:217-222.
632. **Bradshaw JP.** 2003. Cationic Antimicrobial Peptides. *BioDrugs* **17**:233-240.
633. **Ebbensgaard A, Mordhorst H, Overgaard MT, Nielsen CG, Aarestrup FM, Hansen EB.** 2015. Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. *PloS one* **10**:e0144611-e0144611.
634. **Hassan M, Kjos M, Nes I, Diep D, Lotfipour F.** 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of applied microbiology* **113**:723-736.
635. **Heng NC, Tagg JR.** 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology* **4**:160.
636. **Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y.** 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology* **5**.
637. **Kaur S, Kaur S.** 2015. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology* **6**.

638. **Rebuffat S.** 2011. Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?, p. 55-72, Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer.
639. **Belguesmia Y, Choiset Y, Prévost H, Dalgalarondo M, Chobert J-M, Drider D.** 2010. Partial purification and characterization of the mode of action of enterocin S37: a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *Journal of environmental and public health* **2010**.
640. **Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM.** 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology* **49**:23-28.
641. **Lagha AB, Haas B, Gottschalk M, Grenier D.** 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary research* **48**:22.
642. **Hancock RE, Scott MG.** 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:8856-8861.
643. **Bédard F, Hammami R, Zirah S, Rebuffat S, Fliss I, Biron E.** 2018. Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Scientific Reports* **8**:9029.
644. **Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, Levchuk VP, Svetoch OE, Kovalev YN, Stepanshin YG, Siragusa GR, Seal BS, Stern NJ.** 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J Agric Food Chem* **56**:1942-1948.
645. **Messaoudi S, Kergourlay G, Dalgalarondo M, Choiset Y, Ferchichi M, Prevost H, Pilet MF, Chobert JM, Manai M, Dousset X.** 2012. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol* **32**:129-134.
646. **Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ.** 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1094-1100.

647. **Perez RH, Zendo T, Sonomoto K.** 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories* **13**:S3.
648. **Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D.** 2017. Lactobacillus plantarum and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and antimicrobial proteins* **9**:111-122.
649. **Caly DL, Chevalier M, Flahaut C, Cudennec B, Al Atya AK, Chataigné G, D'Inca R, Auclair E, Drider D.** 2017. The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-Clostridium perfringens activity. *International journal of antimicrobial agents* **49**:282-289.
650. **Rihakova J, Cappelletti J-M, Hue I, Demnerova K, Fédérighi M, Prévost H, Drider D.** 2010. In vivo activities of recombinant divercin V41 and its structural variants against Listeria monocytogenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**:563-564.
651. **Grinter R, Milner J, Walker D.** 2012. Bacteriocins active against plant pathogenic bacteria. *Biochemical Society transactions* **40**:1498-1502.
652. **Hetz C, Bono MR, Barros LF, Lagos R.** 2002. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from Klebsiella pneumoniae, induces apoptosis in some human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:2696-2701.
653. **Villarante KI, Elegado FB, Iwatani S, Zendo T, Sonomoto K, de Guzman EE.** 2011. Purification, characterization and in vitro cytotoxicity of the bacteriocin from Pediococcus acidilactici K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (HeLa) cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**:975-980.
654. **Paiva AD, de Oliveira MD, de Paula SO, Baracat-Pereira MC, Breukink E, Mantovani HC.** 2012. Toxicity of bovicin HC5 against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity. *Microbiology* **158**:2851-2858.
655. **Maher S, McClean S.** 2006. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochemical pharmacology* **71**:1289-1298.

656. **Devi Avaiyarasi N, David Ravindran A, Venkatesh P, Arul V.** 2016. In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control* **69**:124-133.
657. **Gaspar D, Veiga AS, Castanho MA.** 2013. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in microbiology* **4**:294.
658. **Zhao H, Sood R, Jutila A, Bose S, Fimland G, Nissen-Meyer J, Kinnunen PK.** 2006. Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: implications for a novel mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1758**:1461-1474.
659. **Cursino L, Šmajš D, Šmarda J, Nardi RMD, Nicoli JR, Chartone-Souza E, Nascimento AMA.** 2006. Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *Journal of applied microbiology* **100**:821-829.
660. **Macé M.** 2010. Membranes d'alumine nano-poreuses pour l'élaboration de nanostructures, Université, d'Aix-Marseille, II.