République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعـلـيـم الـعـالـي والـبـحـث الـعـلـمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الدكتور يحـــي فارس بالمديـــة

Université Dr Yahia Farés de Médéa

كـلـيـــة الـعـلـوم

Faculté du Science

قسـم العـلـوم البـيـولـوجـية

Département de Science Biologique

Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée

Étudié par : Bouchra BAHMED, Sabrina BOUCHERIT & Meriem LAIDANI

Thème

INHIBITION, IN VITRO ET IN SILICO, DES SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINE HOSPITALIERES RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES

Soutenu le Lundi 28/06/2021 à 8h,30 devant le jury composé par :

Amel EULDJI	MAA, U.Y.F.M	Présidente
Khaled OTMANINE	MAA, U.H.B.C	Examinateur
Ahmed AZIZI	**MCA, U.A.T. L**	**Rapporteur de Mémoire**
Mahfoud AINAS	MCB, U.Y.F.M	Co-Rapporteur de Mémoire

INHIBITION, IN VITRO ET IN SILICO, DE SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINE HOSPITALIERES RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES

RESUME. L'objectif de notre étude est l'évaluation de l'inhibition, in vitro et in silico, de souches bactériennes d'origine hospitalier résistantes aux **antibiotiques** qu'elle devient un problème major dans le monde entier. L'inhibition **in vitro** et **in silico** des mécanismes de résistance de *Escherichia coli, staphylocoque aureus et pseudomonas aerginosa* a montré l'efficacité de les **inhibiteurs acide caféique** et **acide gallique** contre *Staphylocoque aureus*, **Tetrahydropyridine** contre *Escherichia coli* et **Trihydrooxyflavone** contre *Pseudomonas aerginosa.* La base de donnés d'après la littérature de l'inhibition de résistance **in vitro** se fait par les différents méthodes de **l'antibiogramme** pour la détermination de concentration minimale inhibitrice (**CMI).**

L'inhibition **in silico** se fait par logiciel appelé **AutoDock Tools** consiste à déterminer l'énergie de fixation entre un **ligand** d'un substance isolée et un **récepteur** d'une bactéries, la plus faible énergie d'interaction entre ces deux dernier présente la meilleures résultats pour chaque bactéries .

MOTS-CLES. Antibiotique, Bactéries résistante, Inhibition in silico, Inhibition in vitro, Inhibiteur.

IN VITRO AND IN SILICO, INHIBITION OF BACTERIAL STRAINS OF HOSPITAL ORIGIN RESISTANT TO ANTIBIOTICS

ABSTRACT. The aim of our study is to assess the extent of inhibition of **hospital bacteria** resistance **in vitro and in silico** that has become a major problem worldwide, as well as the problem of its inhibition by antibiotics has exacerbated. **In vitro and in silico** studies to inhibit the resistance of each of *Escherichia coli, staphylocoque aureus* and *pseudomonas aerginosa* confirmed the efficacy of each of the following **inhibitors**: **Tetrahydropyridine** against *Escherichia coli*, **Caffeic and Gallic acid** against *staphylococcus aureus*, as well as **Trihydroxyflavone** against *Pseudomonas aeruginosa*. The database according to the sources used of the resistance bacteria is inhibited **in vitro** by several techniques called Antibiogramm, through which the minimum inhibitory concentration is calculated **(MIC)**. **In silico inhibition** that we did was done by a program called **Autodock Tools** that calculates the inhibition energy between the **legend** of isolate substance and the **protein** of bacteria, the lowest energy of interaction between these two latter presents the best results for each bacterium.

KEY WORDS. Antibiotics, Resistant bacteria, In silico inhibition, In vitro inhibition, Inhibitor.

التثبيط المخبري والحاسوبي للسلالات بكتيريا المستشفيات المقاومة للمضادات الحيوية

الملخص. الهدف من دراستنا هو تقييم مدى **تثبيط بكتيريا المستشفى المقاومة للمضادات الحيوية حاسوبيا ومخبريا** والذي يمثل مشكل كبير في أنحاء العالم وكذا تفاقم مشكل **تثبيطه بالمضادات الحيوية**. **الدراسة المخبرية والحاسوبية لتثبيط مقاومة** كل من العصيات القولونية والمكورات العنقودية والزائفة الزنجارية أكدت نجاعة كل من المثبطات التالية: رباعي الهيدروبيريدين ضد العصيات القولونية. حمض الكافيك وحمض الغاليك ضد للمكورات العنقودية، وكذا ثلاثي الهيدروكسيفلافون ضد الزائفة الزنجارية. حسب المعطيات المأخوذة من المصادر المستعملة فقد تم تثبيط **مقاومة** البكتيريات **مخبريا** بعدة تقنيات تدعى تحسس الجراثيم **للمضادات الحيوية** حيث يتم من خلالها حساب التركيز التثبيطي الأدنى.

التثبيط الحاسوبي الذي قمنا به تم بواسطة برنامج حاسوبي يدعى **اوتودوك تولز** يقوم بحساب طاقة التثبيط بين **المجند** وكذلك **المستقبل** في البكتيريا وتعد طاقة التثبيط الادنى هي أفضل نتائج المتحصل عليها

الكلمات الرئيسية. المقاومة للمضادات الحيوية، المضادات الحيوية، البكتيريا المقاومة التثبيط الحاسوبي، التثبيط المخبري.

Remerciements

Dieu "الباري" merci pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à Mr AZIZI Ahmed (MCA) notre promoteur de recherche qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils, pour avoir dirigé ce travail et pour sons aides pendant toute la durée de réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres du jury :

Mr AINAS Mahfoude(co-promeuteur), Mlle Amel EULDJI et Mr Khaled OTHMANINE d'avoir accepté de juger ce travail.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Bouchra BAHMED, Sabrina BOUCHERIT & Meriem LAIDANI

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah"بسم الله الرحمن الرحيم", le miséricordieux, qui m'a doté de volonté, du courage, de force et de patience pour pouvoir continuer dans les moments les plus difficiles... de m'avoir aidé à franchir tous les obstacles, me permettant de mener à terme ce modeste travail.

J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

À Mon bras droit, mon pères l'homme qui m'encourage dans tous le moment 'BahmedKheireddinne' et ma tout vie Maman.

Àmes sœurs et mes frères et, ma cher Meriem ; ma puce Sabrina qui je partagée avec elle les bon souvenir de ma vie.

BAHMEDBOCHRA

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah"الحمد لله", j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

Àmon très cher père **Boucherit Saïd**,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et le respect que j'ai toujours pour vous. A l'homme qui m'a aidé à comprendre la vie et devenir plus forte, merci pour tous ce que vous m'avez appris.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployé pour mon éducation.

Àmon grand amour Maman,

L'ange qui me protège pour toujours, à ma source de tendresse de soutiens et de sacrifices, à la femme qui ne cesse de me combler d'amour, vous étiez toujours mon secret de bonheur.

Je te serai reconnaissant toute ma vie, qu'Allah t'accorde longue vie dans la santé

Àmes frères et mes nièces

Àma sœur Bouchra,

Symbole de fidélité, avec Lequel j'ai partagé mes meilleurs moments

Àma chère amie Meriem

Boucherit Sabrina

Dédicaces

Avec l'aide d Allah"ﷻ————————————————الله", j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

À ma chère mère BOURABAA. M

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager et prie pour moi durant toutes les années de mes études.

À mon cher père LAIDANI.Ali.

À ma deuxiém mére sara et ma puce chahinez pour leurs, encouragements permanents, et leur soutien moral.et mes chers frères,

. À tous mes amies sourtout hadjer, razika zahra kawther ,et abira

À mes chérs binome bouchra et sabrina pour tous ses efforts

À tous ceux qui me sont chers et à tous ceux qui m'aiment…,

LAIDANI MERIEM

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIÈRES i

ABRÉVIATIONS & NOMENCLAUTRES iv

LISTE DES FIGURES vi

LISTE DES TABLEAUX ix

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES 3

1.1 BACTERIES D'ORIGINES HOSPITALIERES 3

1.1.1 Définition 3

1.1.2 Principales bactéries d'origines hospitalières 3

1.1.2.1 Escherichia Coli 4

1.1.2.2 Staphylocoques Aureus 4

1.1.2.3 Pseudomonas Aeruginosa 5

1.1.2.4 Autres micro-organismes 5

1.1.3 Différents types des infections causent 5

1.1.3.1 Infection urinaire 6

1.1.3.2 Infection des sites opératoires 6

1.1.3.3 Infection des sites pulmonaire 6

1.1.3.4 Infection des septicémies /bactériennes 6

1.1.3.5 Autres infection 6

1.1.4 FACTEURS DE RISQUE 7

1.1. 4.1 Facteurs liés à l'environnement 7

1.1 .4.2 Facteurs liés au patient 7

1.1.4.3 Facteurs liés à la prise en charge du patient 7

1.1.4.4 Facteurs de risque liés aux soins et aux interventions 8

1.1.5 Réservoirs et sources 8

1.1.5.1 Réservoir endogène 8

1.1.5.2 Réservoir exogène 8

1.1.6 Mécanisme de transmission 8

1.1.6.1Auto-infection 8

1.1.6.2 Hétéro-infection 8

1.1.6.3 Xéno-infection 8

1.1.6.4 Exo-infection 9

1.1.7 Moyens de défense de l'organisme 9

1.1.8 Traitement médicamenteux 9

1.2 Resistance des bactéries aux antibiotiques 10

1.2.1 Antibiotiques 10

1.2.2 Antibiothérapie 10

1.2.3 Critères d'efficacité d'un antibiotique 10

1.2.4 Effets des antibiotiques sur les bactéries 10

1.2.4.1 Bactériostase 11

1 .2.4.2 Bactéricide 11
1.2.5 Mode d'action des antibiotiques 11
1.2.6 Antibio-résistance 12
1.2.7 Quelque mécanisme de résistance 12
1.2.7.1 Efflux actif 12
1.2.7.2 Resistance aux antibiotiques par développements de biofilms 15
1.2.8 Quelque inhibiteur de mécanisme de résistance 17
1.2.8.1 Acide caféique 17
1.2.8.2 Acide gallique 18
1.2.8.3 Tétrahydropyridine 19
1.2.8.4 Trihydroxyflavone (TF) 19
1.2.9 Activité des antibiotiques 19
1.2.9.1 ANTIBIOGRAMME 20
1.2.9.2 Méthodes d'antibiogramme 20
1.2.10 Critères de catégorisation de l'antibiogramme 21
1.2.11 SYNERGIE DES ANTIBIOTIQUES 22
1.3 In silico 23
1.3.1 Bioinformatique 23
1.3.2 Inhibition in silico 23
1.3.3 Criblage virtuel 24
1.3.4 Criblage par docking Moléculaire 24
1.3.5 Outils de Docking 25
1.3.5.1 Programmes 25
1.3.5.2 Récepteur 29
1.3.5.3 Ligand 29
CHAPITRE 2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES
2.1Etude *in vitro* 30
2.1.1Inhibition de S. AUREUS résistants aux antibiotiques 30
2.1.2 Inhibition de E. coli résistants aux antibiotiques 30
2.1.3 Inhibition de P.aeruginosa résistants aux antibiotiques 30
2.2Matériels 31
2 .3 METHODE 32
2.3.1 Escherichia coli 32
2.3.1.1 Détermination de la CMI 32
2.3.2 Staphylocoque aureus 32
2.3.2.1 Préparation des substances 32
2.3.2.2 Préparation et standardisation de l'inoculum 32
2.3.2.3 Tests de concentration minimale inhibitrice 33
2.3.2.4 Tests d'inhibition de la pompe à efflux 33
2.3.3 Pseudomonas Aeruginosa 33
2.3.3.1 Extraction et isolement du composé de la feuille d'A. Scholaris 33
2.3.3.2 Préparation de P.aeruginosa 34
2.3.3.3 Inhibition de la formation de biofilm /QS 34
2.3.3.4 Détermination de l'inhibition de la formation biofilm au microscope optique 34
2.4 Etude *in silico* 36
2.5 Matériels 36
2.5.1 Programmes 36
2.5.2 Banques de données et les sites internet 36
2.5.2.1 PDB (Protéine Data Bank) 36
2.5.2.2 PubChem 36
2.5.2.3 Récepteurs (les protéines) 37

2.5.2.4 Inhibiteurs utilisés 39
2.5.2.5 Protéine Plus 40
2.6 Méthodes 42
2.6.1 Préparation de la protéine 42
2.6.2 Préparation d'un fichier ligand pour AutoDock 43
2.6.3 Préparation de macromolécule 43
2.6.4 Préparation du fichier de paramètres de Grid 44
2.6. 5 Préparation du fichier de paramètres de docking 44
2.6.6 Démarrage d'AutoGrid 44
2.6.7 Démarrage d'AutoDock 45
2.6. 8 Analyse et lecture des résultats d'AutoDock 45
2.6.9 Afficher les interactions 48

CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION

3.1 Inhibition in vitro et in silico le mécanisme de l'efflux chez *E.coli* par les dérives de Tetrahydropyridine 52
3.2 Inhibition in vitro/in silico efflux pump des *s.aeureus* par acide caféique et l'acide gallique 60
3.3Inhibittion la formation des Biofilm de pseudomonas aerginosa in silico par 3, 5, 7-Trihydroxyflavone d'Alstonia scholaris 67
3.4 Comparaison 77

CONCLUSION GENERALE 78
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 79

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	***Signification***
ATB	Antibiotique
ATDT	Autodock Tools
BGN	Bactérie A Gram Négatif
BGP	Bactérie A Gram Positif
BMR	Bactéries Multi Résistance
CINIAPCS	Clinical Investigation Of Nosocomial Infections In Adult Patients After Cardiac Surgery 2021
CMB	Concentration Minimal Bactéricid
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
E.COLI	Escherichia Coli
IH	Infection Hospitaliers
IN	Infection Nosocomiale
ISO	Infection Du Site Opératoire
Kcal/mol	Kilo Calories / Mol
MO	Micro-organismes
OMS	Organisation Mondiale De La Santé
P.Aeruginosa	*Pseudomonas Aeruginosa*
PDB	Proteine Data Banque
QS	Quorum Sensing
S. aureus	*Staphylococcus Aureus*
TF	*Trihydroxyflavone*

LISTE DES FIGURES

Chapitre I. Synthèse bibliographiques		
Numéros	**Titres des figures**	**Pages**
1.1	Les 10 microorganismes les plus fréquemment	4
1.2	*Echerichia coli* sous le microscope	4
1.3	*Staphyloccocus auereus* sous le microscope	5
1.4	*P. Auerginosa* sous le microscope.	5
1.5	Répartition des infections les plus fréquentes cause par bactéries d'origines hospitalières	7
1.6	Mode d'action des antibiotiques	12
1.7	Représentation du phénomène d'efflux	13
1.8	Système AcrAB-tolc chez *E.coli*	14
1.9	Système efflux pump chez *staphyloccocus aureus*	15
1.10	Etapes de formation les biofilms.	16
1.11	Mécanisme de quorum sensing de *P. arginosa*	17
1.12	Structure 2D de l'acide caféique	18
1.13	Structure 2D de l'acide gallique	18
1.14	Structure 2D de tétrahydropyridine	19
1.15	Structure 2D de trihydroxyflavone	19
1.16	Méthode de dilution en milieu liquide	21
1.17	Diffusion en milieu gélosé	21
1.18	Critère de la lecture antibiogramme	22
1.19	Criblage virtuel in-silico	24
1.20	Représentation schématique du docking de deux molécules. Protéine. Ligand. Complexe moléculaire	25
1.21	Les programmes de docking les plus cités d'après	26
1.22	Logo de logicielle ADT	27
1.23	Capture d'écran programme AutoGride	28
1.24	Exemple d'ajout hydrogène sur la protéine	28
1.25	Capture d'écran représente plan de grill	29

Chapitre 2. Matériels& Méthodes		
Numéros	**Titres Des Figures**	**Pages**
2.1	Méthode de diffusion de disque	32
2.2	Feuilles d'Alstonia Schoris	34
2.3	Capture d'écran de l'interface de Protein Data Bank	36
2.4	Interface de Pubchem	37
2.5	Interface de proteinsplus	41
2.6	Exemple de sélectionné chaine de protéine	42
2.7	Interface pour ajout hydrogène	43
2.8	Exemple d'ajout hydrogène sur la protéine	43
2.9	Capture d'écran représente plan de grill	44
2.10	Démarrage d'autogrid	2.10
2.11	Interface de mode de lecture	46
2.12	Capture d'écran pour les options de lecture	46
2.13	Interface de build h-bonds	47

2.14	Interface de show info	47
2.15	Les étapes de docking moléculaire par autodock	48
2.16	Exemple de l'interaction 3D de protéine-ligand réalisé par autodock	49
2.17	Interface des options de lecture	49
2.17	Préparation le ficher de complexe dans ProteinsPlus	50
2.18	Interface les fonctions de ProteinsPlus	50
2.20	Préparation de ligand	51
2.21	Exemple de l'interaction 2D réalisé par ProteinsPlus	51

Chapitre 3. Résultats Et Discussion

Numéros	**Titres Des Figures**	**Pages**
3.1	Résultat de docking de tétrahydropyridine avec chaine A	52
3.2	Résultat de docking de tétrahydropyridine avec chaine B	53
3.3	Résultat de docking de tétrahydropyridine avec chaine C	53
3.4	Meilleur conformation de tétrahydropyridine pour la chaine A, B et C	54
3.5	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 4dx5-A et tetrahydropyridine	56
3.6	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 4dx5-B et tetrahydropyridine	56
3.7	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 4dx5-C et Tetrahydropyridine	56
3.8	Histogramme de résultat de conformation pour tétrahydropyridine avec (1) 4dx5-A, (2) 4dx5-B et(3) 4dx5-C	58
3.9	Résultat final de docking pour 4dx5-A	59
3.10	Résultat final de docking pour 4dx5-B	59
3.11	Résultat final de docking pour 4dx5-C	59
3.12	Résultats de docking de l'acide caféique	60
3.13	Résultat de docking acide gallique	60
3.14	Conformation de l'acide caféique/ l'acide gallique	61
3.15	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre Nora efflux pumps et l'acide caféique.	62
3.16	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre Nora efflux pumps et l'acide gallique.	62
3.17	Interaction entre acide caféique et 2gfp, (A) structure 3d et (B) 2D	63
3.18	Interaction entre acide gallique et 2gfp, (A) structure 3d et (B) 2D	64
3.19	Histogramme de résultat de conformation	64
3.20	Dock caffiec_vs résultat final de docking	65
3.21	Dock gallic_vs résultat final de docking	65
3.22	Conformation de TF avec 2uv0 et 2br6	68
3.23	Conformation de TF avec 1kzf et 1ro5	68
3.24	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 2br6 et TF	69
3.25	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 1kzf et TF	69
3.26	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 1ro5 et TF	70
3.27	Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 2uv0 et TF	70
3.28	Interaction entre 2br6 et TF(A)3D et (B) 2D	71
3.29	Interaction 1ro5 et TF (a) 3D et (B) 2D	72
3.30	Interaction entre 2uvo et TF, (A) 3d et (B) 2D	72
3.31	Interaction 1kzf et TF, (A) 3D et (B) 2D	73
3.32	Histogramme de résultat de conformation de TF avec (1) 2uv0 et (2) 2br6	74
3.33	Histogramme de résultat de conformation de TF avec (1) 1kzf et (2)	74
3.34	Résultat final de docking pour 2uv0	75

3.35	Résultat final de docking pour 1ro5	75
3.36	Résultat final de docking pour 1kzf	75
3.37	Résultat final de docking pour 2br6	76

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I. Synthèses bibliographiques		
Numéros	**Titre des tableaux**	**Pages**
1.1	Principaux programmes de Docking moléculaire	31
Chapitre 2. Matériels& Méthodes		
Numéros	**Titre des tableaux**	**Pages**
2.1	Matériel utiliser in vitro	31
2.2	Structure pdb des protéines utilise dans notre travailles	38
2.3	Structure des inhibiteurs utilisés chez les bactéries dans notre étude	40
Chapitre 3. Résultats et discussion		
Numéros	**Titre des tableaux**	**Pages**
3.1	Positions possibles pour interaction de Tetrahydropyridine avec 4DX5	55
3.2	Energie de fixation d'acide caféique et acide gallique avec 2gfp	66
3.3	Comparaison de l'énergie de fixation entre les résultats de notre étude et étude antérieurs	76

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Les infections bactériennes ont augmenté dans le monde entier, étant responsables de l'augmentation des taux de mortalité et les coûts de santé publique, parmi ces microorganismes *(Sarkissian ,2016)*. Un groupe des bactéries plus étudiés sont origines hospitalières résistantes aux antibiotiques et qui représente la cause de la moitié (50%) des infections hospitalières. Les plus concerné distribué entre des bactéries a gram positif *Staphylococcies aureus* et des bactéries a gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. *(Joycy ,2018)*

Ces souches bactérienne l'un des plus difficiles microorganismes à traiter car ils ont une forte capacité de colonie l'hôte, ainsi que les manifestation des infections nosocomiales et le développement de résistances à une grande variété d'antibiotiques. *(Joycy ,2018)*

Les bactéries d'origine hospitaliers sont des bactéries qui se trouve dans ces milieux différencies aux bactéries communautaires par leur résistances à plusieurs antibiotiques en raison de leur utilisation massive et parfois inappropriée. Ces bactéries provoquent 90 % de l'infection hospitalière appelé aussi bactéries nosocomiale *(CINIAPCS,2021)* qui sont touchés surtout les patients passe aux moin de trois jours dans l'hôpital.(Jerome et al., 2018*).*

De plus, les nombres des bactéries nosocomiales présentes dans les isolats cliniques tel qu'antibiogramme résistants à plusieurs antibiotiques sont en constante augmentation par le développement de différents mécanismes de résistance.

Les bactéries d'origine hospitaliers deviennent résistantes aux antibiotiques en obtenant des efflux pompes, la formation de biofilm et par système de quorum sensing, conduisant à l'émergence de mécanismes de résistance. *(Bernard et al., 2004 ; Lima et al., 2005)*

Ces mécanismes comprennent des changements au niveau des antibiotiques surtout des modifications du site actif.

La découverte des antibiotiques a révolutionné les pratiques de médicales et on a laissé penser que la guerre contre ces infections était gagnée, mais on a assisté par la suite à une émergence des nouveaux mécanismes de résistance, entraînant la diffusion des bactéries pathogènes les plus en plus difficiles à traiter *(el abdani, 2016).*

Le développement de mécanismes de résistance conduit a l'amélioration des antibiotiques pour l'inhibition de ces mécanismes soit au niveau de laboratoire (in vitro) soit par modélisation informatique (in silico).

De nombreuses études sont en cours afin de trouver des nouvelles substances certaine isolés de plantes, ainsi que des extraits et des huiles, qui montré de bons résultats en ce qui concerne l'inhibition de cette mécanisme *(Mikulášová et al ., 2016 ;Limaverde et al., 2017),* peut-être utilisées comme adjuvants aux antimicrobiens ou pour empêcher l'acquisition d'un autre mécanisme de résistance *(Lomovskaya, 2001).*

Donc les bactéries hospitalières résistants aux antibiotiques constituent un véritable problème de santé publique dans les milieux de soins, en particulier dans les hôpitaux.

L'objectif de notre étude consiste a évalué l'inhibition in vitro et in silico des souches bactérienne d'origine hospitaliers les plus fréquent *Staphylococcies aureus, Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux antibiotiques.

L'étude in vitro comprend l'évaluation de l'inhibition de ces souches bactériennes on a suivi toutes les méthodes et les résultats d'après la littérature. L'inhibition in silico se fait par logiciel informatique appelé AutoDock Tools consiste à déterminer l'inhibition d'une protéine bactérienne par des nouvelles substances isolées .

Notre étude sera présentée en trois chapitres :

- ***1ere partie***, consacré à un rappel sur la littérature concernant ;
- ***2ieme partie*** décrit le matériel et les méthodes utilisées pour l'élaboration de ce travail ;
- ***3ième partie***, portera sur l'exposé des résultats obtenus et aux discussions et elle est clôturée par une conclusion et perspectives.

CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 BACTERIES D'ORIGINES HOSPITALIERES

1.1.1 DEFINITION

Les hôpitaux sont des milieux qui réunissent de différentes maladies, et constituent un milieu propice pour la propagation des bactéries résiste aux ATB, lorsque les conditions d'hygiène et environnementales ne sont pas favorables *(Glenn et al., 2014).*

Les bactéries d'origine hospitaliers sont des bactéries qui se trouve dans ces milieux différencies aux bactéries communautaire par leur résistances à plusieurs ATB en raison de leur utilisation massive et parfois inappropriée. Ces bactéries provoquent 90 % de l'infection hospitalière (infection nosocomiale) *(inia, 2021)* qui sont touche surtout les patients passe aux mois de trois jours dans l'hôpital. *(jérom etienne et al., 2016).*

D'après l'OMS les IH provoque un grand problème dans le monde, et environ 5 à 12% des patients hospitalisés développent une IH. *(Amazian et al., 2010)*

En Algérie le taux de ces infection attente les 15% et que 50 à 60% des cas elles se transmettent par les mains, 5% des bactéries qui circulent en milieux hospitaliers sont multi résistes aux ATB *(Glenn et al., 2014).*

1.1.2 PRINCIPAUX BACTERIES D'ORIGINES HOSPITALIERES

Il y a plusieurs types des bactéries d'origines hospitalières, les principaux qui ont les plus incrimines et responsables 50 % des cas des infections hospitaliers sont : *E.coli* , *S. aureus* et *P. arginosa (Aodhan,2016).* Ces bactéries sont multi résistance, caractérisé par leur capacité d'adaptation face a un environnement ubiquitaire ou hostile et même en absence d'exigence nutritionnelles et leur pouvoir pathogènes *(Glenn et al., 2014).*

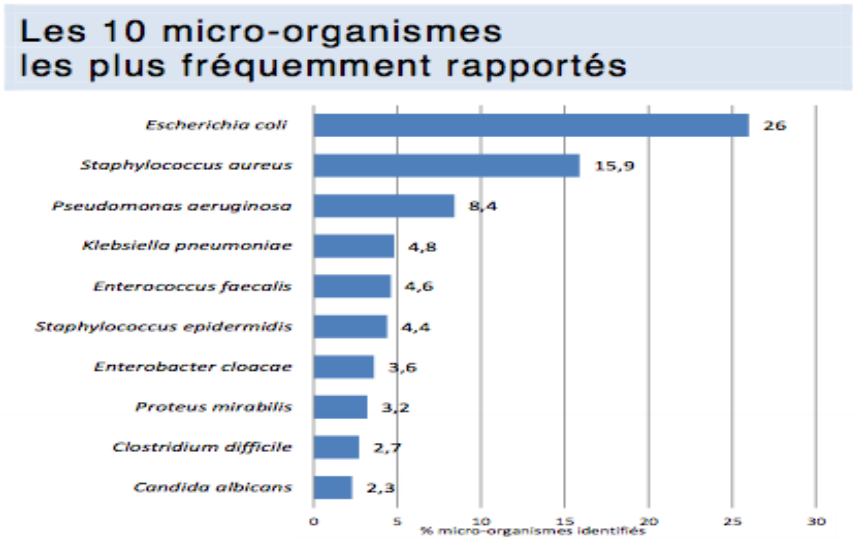


Fig.1. les 10 microorganismes les plus fréquemment *(Aodhan,2016).*

1.1.2.1 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli (E. coli) est une bactérie intestinale à Gram négatif inoffensive commensal, mais ces dernières années, certaines souches sont devenues pathogènes et ont causé nombre d'infections graves.les souches multi résistantes (BMR) d'E.coli sont endémiques dans établissements de soins de santé dans le monde et augmentent les risques de infections nosocomiales acquises *(Lie, 2002)*



Fig.2. *Escherichia coli* sous le microscope *(Lie, 2002).*

1.1.2.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

C'est une bactérie Gram-positive associée avec des infections de la peau, des plaies et des tissus mous, en plus d'être désigné comme la cause d'endocardite et d'infectionliées à des implants de dispositifs, tels que valves et cathéters *(Widad, 2016).*

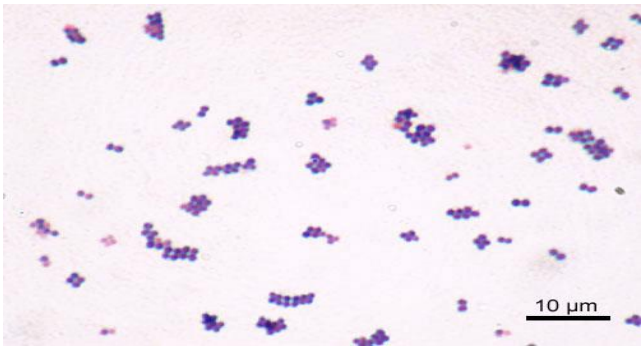


Fig .3. *Staphyloccocus aureus* sous le microscope *(Widad, 2016).*

1.1.2.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Bacilles à Gram négatif ne fermentant pas le glucose (BGNnF), largement présent dans l'environnement (eau, sol, végétaux). Après *Escherichia coli* et *Staphylocoques aureus, P. aeruginosa* est la troisième bactérie responsable d'infection nosocomiale.

Elle est très mobile, asporulée et mesure de 0,5-0,8 × 1,5-3,0 µm. La membrane externe contient des porines dont le nombre et la taille, susceptibles de varier, conditionnent la perméabilité aux antibiotiques. La structure du LPS (lipopolysaccharide) de cette membrane est également très hétérogène *(Lie, 2002).*



Fig.4. .*P. aerginosa* sous le microscope *(Lie, 2002).*

1.1.2.4 AUTRES MICRO-ORGANISMES

Les virus et les champignons peuvent êtres aussi la cause des infections hospitaliers comme les virus grippaux et les candidas *(Widad, 2016).*

1.1.3 DIFFERENT TYPES DES INFECTION CAUSENT

Environ 80% de toutes les infections hospitalières concernent quatre sites principaux. *(Infections nosocomiales | Inserm - La science pour la santé)*

1.1.3.1 INFECTION URINAIRE

Les IU sont les plus courantes dans les infections hospitaliers représentent 30% des cas, définit par la multiplication au maximum deux espèces bactériennes dans les voies urinaire, ces bactéries proviennent de la flore intestinale du patient, normale (*E.coli*) ou acquise à l'hôpital *(prévention des infections nosocomial livre).*

1.1.3.2 INFECTION DES SITES OPERATOIRES

Les ISO représentent 13,5% des cas d'infections hospitaliers se manifestant dans les 30 jours suivant l'intervention ou, s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervient *(Prévention des infections nosocomiales livre).*

1.1.3.3 INFECTION DES SITES PULMONAIRE

Ils existent dans 17% des cas d'infections hospitaliers se développe au moins 48 H après l'hospitalisation. Les agents pathogènes les plus fréquents sont des bacilles G+ et *S. aureus (Sanjay, 2019).*

1.1.3.4 INFECTIONS DES SEPTICEMIES / BACTERIENNES

Dans 10,1% des cas, les patients sont atteints de **bactériémies/septicémies** liées à l'introduction **des cathéters** dans les voies sanguines, et possèdent un taux de létalité élevé – plus de 50 % pour certains micro-organismes. *(Les principaux germes et infections nosocomiales infonosocomiale.fr)*

1.1.3.5 AUTRES INFECTION (représentent environ 13% des IN)

De très nombreuses autres infections sont possibles, on peut citer des infections du système nerveux central, de la peau, du tube digestif, des voies génitales après instrumentations ou interruption de grossesse, des régions buccale et périnéale. Toutes ces infections peuvent être à l'origine de bactériémies avec une fréquence variable selon le degré de l'immunosuppression et la nature des germes en cause *(Widad, 2016).*

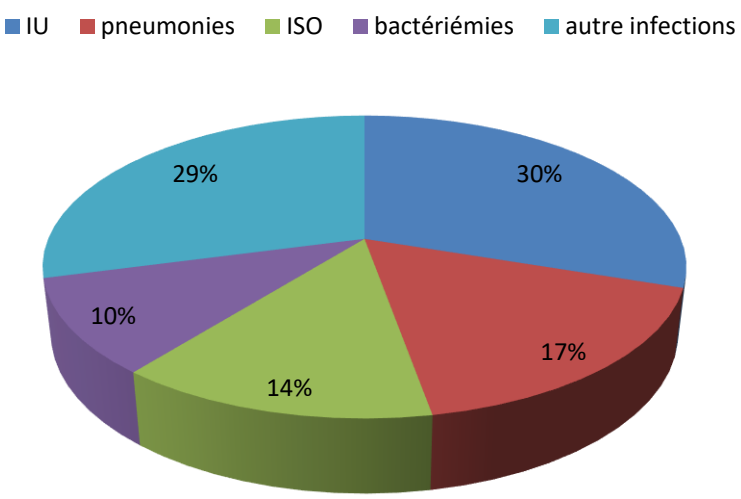


Fig.5. Répartition des infections les plus fréquentes cause par bactéries d'origines hospitalières

1.1.4 FACTEURS DE RISQUE

Les facteurs qui favorisent le développement des bactéries d'origine hospitaliers dans un site spécifique sont :

1.1.4.1 FACTEURS LIES A L'ENVIRONNEMENT

- Les surfaces ;
- Les déchets ;
- L'air et l'eau *(widad, 2016)* .

1.1.4.2 FACTEURS LIES AU PATIENT

- Les patients âgés et les nouveau-nés ;
- Poids : il s'agit de l'obésité et de l'insuffisance pondérale ;
- Terrain : dénutrition, immunodépression, diabète, éthylisme, état de vigilance ;
- Traitements immunosuppresseurs, antibiotiques : durée, motif de prescription *(tambyah et al., 2014).*

1.1.4.3 FACTEURS LIES A LA PRISE EN CHARGE DU PATIENT

Résistance au Antibiotiques à cause de mauvaise prescription :

- l'utilisation excessive des antibiotiques ;
- Les diagnostics incorrects suivis d'antibiothérapie ;

- L'utilisation inappropriée d'antibiotiques par les patients eux-mêmes. *(Widad, 2016)*

1.1.4.4 FACTEURS DE RISQUE LIES AUX SOINS ET AUX INTERVENTIONS

- Antécédent d'intervention chirurgicale.
- Exposition à un dispositif invasif (sondage urinaire ou cathéter vasculaire) *(tambyah et al., 2014)*
- Intubation orotrachéale ou trachéotomie.
- Endoscopie *(Schuman et al., 2010)*

1.1.5 RESERVOIRS ET SOURCES

Le réservoir d'un agent infectieux est l'endroit où il maintient sa présence en se multipliant. Ce réservoir peut être humain, animal, environnemental ou mix, tandis que la source est le lieu de contact entre l'agent infectieux et l'hôte, les deux peuvent être confondus ou distincts, ce qui est important sur le plan épidémiologique et préventif. *(SFAR, 2009)*

1.1.5.1 RESERVOIR ENDOGENE

C'est à dire que le malade infecte par lui-même, il se contamine par ses propres germes. Qui conduisent à la colonisation des sites préférentiels chez le patient. *(Prévention de la transmission croisée en réanimation. 2002)*

1.1.5.2 RESERVOIR EXOGENE

Soit infections croisées qui transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical, ou un infections provoquées par les micro-organismes portés par le personnel soignant ,soit un infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier *(Prévention de la transmission croisée en réanimation. 2002).*

1.1.6 MECANISME DE TRANSMISSION

Il existe quatre mécanismes de transmission :

1.1.6.1 AUTO-INFECTION

Le patient hospitaliers ils peuvent infecte par ses propres germes de sa flore originale ex : E.col ou de sa flore remaniée. *(Qassimi, 2010).*

1.1.6.2 HETERO-INFECTION

C'est la contamination d'un malade par les bactéries d'un autre malade *(Qassimi, 2010).*

1.1.6.3 XENO-INFECTION

Est due à l'entrée dans la communauté hospitalière de nouveaux malades, plus rarement de personnel ou des visiteurs porteurs d'une maladie infectieuse.

1.1.6.4 EXO-INFECTION

Est liée à des erreurs ou des insuffisances dans les techniques d'asepsie. *(Qassimi, 2010).*

1.1.7 MOYENS DE DEFENSE DE L'ORGANISME

L'organisme dispos d'une série de mécanismes de défense contre les infections.

Ces mécanismes peuvent être altérés par de nombreux facteurs liés soit à l'affection de base présentée par le patient, soit à divers médicaments ou actes médicaux. *(Gross, 2007)*

1.1.8 TRAITEMENT MEDICAMENTEUX

Divers médicaments peuvent altérer les défenses de l'organisme par exemple les antibiotiques perturbent la flore normale et favorisent la colonisation et les infections par les germes hospitaliers *(koorner, 1997).*

1.2 RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUE

1.2.1 ANTIBIOTIQUE

Le terme d'antibiotique, vient du grec « bios » qui signifie la vie et « anti » qui signifie contre. Le rôle d'un antibiotique vient de son nom : c'est donc littéralement « agir contre la vie ». Un antibiotique est donc une substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui inhibe la croissance bactérienne. Dans le langage médical, un antibiotique est « une substance chimique organique d'origine naturelle ou synthétique, inhibant ou tuant les bactéries pathogènes à faible concentration et possédant une toxicité sélective. *(Paul Battraud, 2017)*

1.2.2 ANTIBIOTHERAPIE

L'antibiothérapie probabiliste vise à prévenir une infection non caractérisée sur le plan microbiologique, mais est effectuée du fait d'un diagnostic clinique, ou en attente d'un résultat bactériologique.

L'objectif usuel de l'antibiothérapie est de diminuer suffisamment le nombre de bactéries présentes pour que le système immunitaire puisse éliminer les bactéries restantes. Cependant, si le système immunitaire est altéré (exemples : maladies auto-immune, infection par le virus du SIDA, immunodépression suite à une chimiothérapie…) ou si l'infection fait courir un risque vital, il devient nécessaire que l'antibiotique détruise toutes les bactéries. Il faut aussi que dans les conditions d'administration qui permettent d'obtenir l'effet antibactérien, l'antibiotique n'induise pas ou peu d'effets indésirables inacceptables voire toxiques à d'autres niveaux et dégrade les autres organes sains. *(Sophie, 2014)*

1.2.3 CRITERES D'EFFICACITE D'UN ANTIBIOTIQUE

Pour que l'antibiotique choisi puisse être actif sur la ou les bactéries à l'origine de l'infection, il faut:

- qu'il possède un mode d'action qui lui permette d'agir sur cette bactérie ;
- qu'il parvienne là où est la bactérie et à des concentrations suffisamment élevées ;
- qu'il y reste le temps suffisant pour lui permettre soit de la détruire, c'est ce que l'on appelle la bactéricide soit d'en arrêter la multiplication, c'est la Bactériostase. *(Paul Battraud, 2017)*

1 .2.4 EFFETS DES ANTIBIOTIQUES SUR LES BACTERIES

On différencie les antibiotiques à effet bactéricide, des antibiotiques à effet bactériostatique.

1.2.4.1 BACTERIOSTASE

Consiste en un ralentissement de la croissance bactérienne pouvant aller jusqu'à une absence de croissance. L'effet (ou activité) bactériostatique d'un ATB sur la population d'une souche bactérienne est indiqué par la détermination de la mesure de la CMI qui est définie comme la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'interrompre, dans un milieu et à des conditions parfaitement définis (après 18 heures à 37 °C), toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée .*(Soilleux M, 2008)*

1.2.4.2 BACTERICIDE

Consiste en la destruction d'une partie de la souche bactérienne. L'effet (ou activité) bactéricide d'un ATB sur une souche bactérienne est indiqué par la détermination de la mesure de la CMB qui est définie comme la plus faible concentration de cet ATB permettant une réduction du nombre de survivants de la population de cette souche au moins égale à 10-4 bactéries/ml d'un inoculum de 10-6 bactéries après 18h de culture à 37°C de cette souche en présence de l'ATB *(Soilleux M, 2008)*.

Un antibiotique est bactéricide si la CMI est égale à la CMB. Il sera bactériostatique dans le cas où la CMI est très inférieure à la CMB. On parlera d'antibiotique tolérant pour un antibiotique dont le rapport CMB / CMI donnera un résultat très supérieur à 32 *(Soilleux M, 2008)*.

1.2.5 MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES

La plupart des antibiotiques dérivent de substances naturelles végétales, ou produites par de microorganismes pour tuer d'autres micro-organismes. Dans les cellules bactériennes, plusieurs types de cibles se sont montrées particulièrement vulnérables à l'action d'inhibition des antibiotique (figure 6) *(Nauciel, 2005 ;Karp, 2010).*

- Action sur la paroi bactérienne
- Action sur la structure de la membrane
- Action sur la synthèse protéique
- Action sur la synthèse de l'ADN
- Action sur le métabolisme de l'acide folique *(Meriem, 2018).*

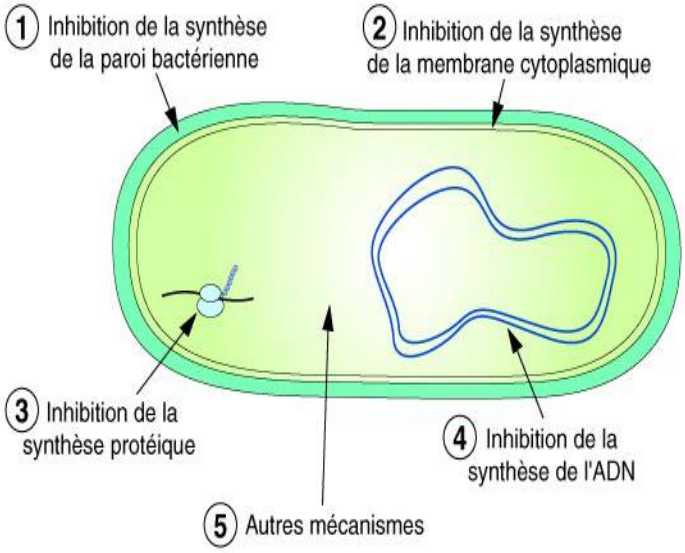


Fig.6. Mode d'action des antibiotiques *(Meriem, 2018).*

1.2.6 ANTIBIO-RESISTANCE

Pour un traitement, quel qu'il soit, son efficacité à soigner une pathologie est fortement menacée par l'apparition potentielle d'une résistance. Pour un antibiotique, c'est son efficacité à lutter contre un germe qui est concerné. En effet ce dernier peut développer une résistance vis-à-vis de l'antibiotique. La résistance bactérienne est définie comme la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques ou des biocides censés les contrôler ou les tuer *(http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application).* Le phénomène d'antibio-résistance n'est pas nouveau, mais le nombre de microorganismes résistants, et multi-résistants, ainsi que les localisations géographiques affectées ne cessent de croître dans des proportions inquiétantes. Les traces d'antibio-résistance ont d'abord été détectées dans les hôpitaux, lieux où les antibiotiques sont le plus utilisés. *(Levy, 2004).*

1.2.7 QUELQUE MECANISME DE RESISTANCE

1.2.7.1 EFFLUX ACTIF

Il s'agit d'un système actif reposant sur la présence de protéines particulières jouant le rôle de pompe permettant l'expulsion des molécules nocives pour la bactérie, dont les antibiotiques, dès qu'ils pénètrent dans la cellule bactérienne. Cela entraîne une diminution de la quantité

d'antibiotique atteignant la cible. *(mammedi , 2008).* De nombreux systèmes de ce type ont été identifiés chez les bactéries et rendus responsables de résistance à des antibiotiques très variés, ainsi qu'à des antiseptiques *(Calgagno, 2011).* Une des caractéristiques de ce mécanisme est qu'il peut entraîner parfois la résistance simultanée à des antibiotiques non reliés structurellement, et ainsi constituer de véritables systèmes de multi-résistance. En général, les systèmes d'efflux spécifique sont acquis par la bactérie et n'apportent rien d'autre qu'une résistance de haut-niveau vis-à-vis de l'antibiotique excrété. Les systèmes d'efflux multiples seront, eux, présents naturellement chez l'espèce bactérienne. Leur fonction initiale est d'excréter les molécules toxiques présentes dans l'environnement de la bactérie. Ces systèmes peuvent être surexprimés en raison d'une mutation des gènes régulateurs, ce qui conduit à une résistance de bas-niveau à certains antibiotiques. Enfin, la résistance par efflux est souvent associée à une imperméabilité par altération des porines. *(Calgagno, 2011).*

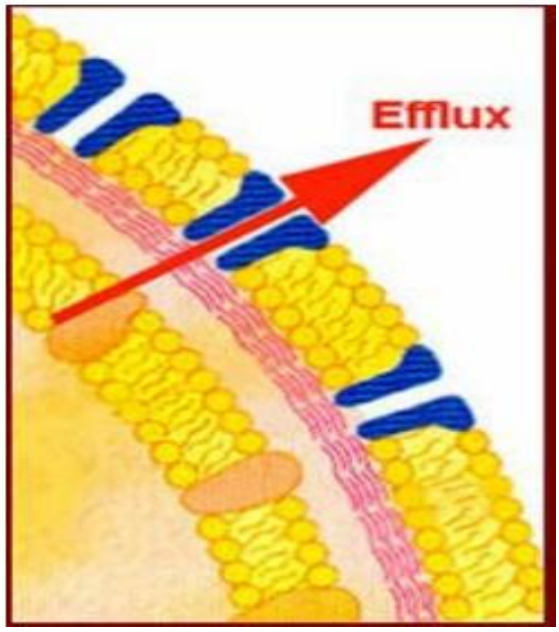


Fig.7. Représentation du phénomène d'efflux *(Calgagno, 2011).*

A. CHEZ *E.COLI*

Le système AcrAB-TolC présent dans *Escherichia coli* consiste en une protéine de transport (AcrB) ancrée dans la membrane plasmique qui s'étend jusqu'au périplasme, une protéine (TolC) qui forme un canal à travers la membrane externe et une protéine adaptatrice (AcrA) située dans le périplasme.

Les substrats de ces pompes présentent une diversité de structures chimiques ; cependant, ils partagent tous une lipophile élevée significative. Certains antibiotiques et un certain nombre d'inhibiteurs ont été cocristallisés avec la pompe AcrB et ont été utilisés pour étudier les interactions de liaison au sein de la liaison du substrat site. *(Heba Abdel-Halim et al., 2019)*

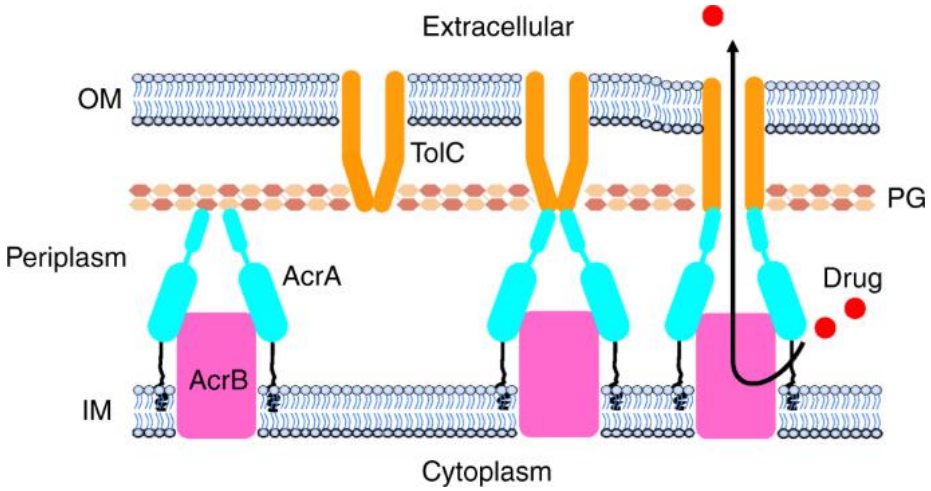


Fig.8.. Système AcrAB-TolC chez *E.coli* *(Heba Abdel-Halim et al., 2019).*

B. CHEZ *S. AUREUS*

De plus, le nombre de souches de S. aureus présentes dans les isolats cliniques résistants à médicaments multiples est en augmentation, L'efflux actif est causé par des protéines transmembranaires capables de expulser ou échanger des composés toxiques hors de la cellule bactérienne, permettant la survie du micro-organisme, parmi les pompes les plus étudiées sont NorA La pompe NorA est responsable pour l'efflux de divers médicaments tels que les fluoroquinolones, quinolones, vérapamil et oméprazole, ainsi que des colorants tels que l'acridine et le bromure d'éthidium, appartenant à la superfamille des principaux facilitateurs. *(Dos Santos et al., 2017).*

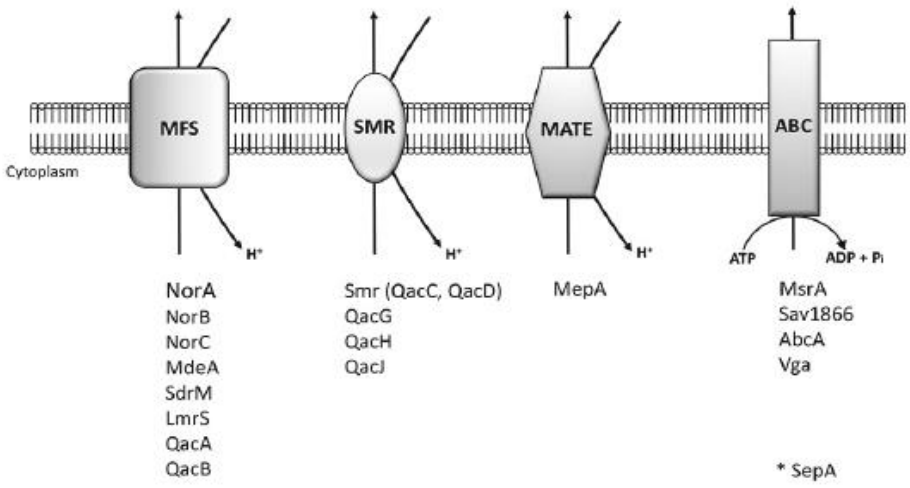


Fig.9. Système efflux pump chez *staphyloccocus aureus (Dos Santos et al., 2017).*

1.2.7.2 RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES PAR DEVELOPPEMENT DE BIOFILM

De nombreux problèmes sont associés au développement des biofilms en milieu médical, et ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens que ce soit les antibiotiques ou les désinfectants. Cette résistance accrue, multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.), elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus. La résistance élevée des biofilms aux agents anti-bactériens pourrait également reposer sur la présence d'une subpopulation de bactéries résistantes, capables de résister à de fortes concentrations d'antibiotiques. Cette configuration d'agglomération de colonies favorise les transferts de gènes de résistance entre bactéries. Ainsi, alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, les résistances bactériennes liées à la présence de biofilms échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces dès lors qu'il existe un biofilm et les symptômes peuvent réapparaître une fois le traitement fini *(Ploy, 2012)*

A. CHEZ *P. AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa est capable de vivre soit à l'état planctonique une forme planctonique qui permet a la bactérie de déplace de manier isole grâce à ça son flagelle mais les bactéries vivent généralement en biofilm soit à l'état sessile fixé à un support qui définit comme une population bactérienne adhérente à une surface et enrobée d'une matrice constituée de substances polymériques extracellulaires (EPS) *(Ploy, 2012).*

B. ETAPES DE FORMATION DES BIOFILM

La première étape consiste en l'attachement initial de la bactérie à la surface d'une muqueuse ou d'un matériel inorganique, Lors d'une deuxième étape elles synthétisent des polymères dont elles s'entourent pour se protéger, l'adhésion devient alors irréversible et les micros colonies se structurent. La distribution des cellules bactériennes devient hétérogène au sein du biofilm (maturation). Le biofilm se développe et adopte une structure en forme de champignon, d'une épaisseur maximale de 100 µm. Les cellules se détachent de cette structure et se dispersent pour reformer un nouveau biofilm *(Ploy, 2012).*

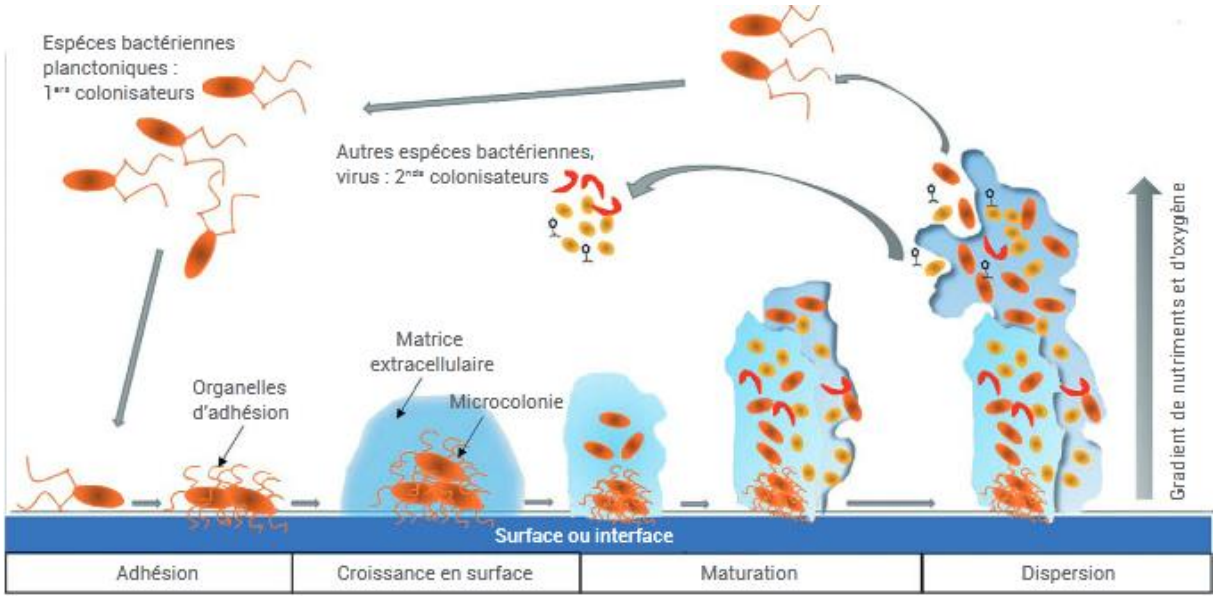


Fig. 10. Etapes de formation les biofilm *(Ploy, 2012).*

La formation et le développement du biofilm dépend de signaux environnementaux et bactériens dont ceux du quorum sensing, C'est un système de communication entre les bactéries qui leur permet de coordonner leur comportement. Ces molécules de QS ont été libérées lors de la production de l'accumulation bactérienne, ce type de signalisation était également connu sous le nom d'auto inducteur (AI) *(Ploy, 2012).*

Il existe deux systèmes de QS, nommés **Las** et **Rhl**, ont été identifiés chez *P.aeruginosa*, chaque système se définit par un couple composé d'une protéine régulatrice et d'un enzyme auto inductrice : LasR/LasI pour le système **Las** et RhlR/RhlI pour **Rhl**.

L'enzyme auto inductrice contribue à la synthèse de petites molécules, les acylhomosérine lactone (**AHL**) qui diffusent facilement de bactéries à bactéries. Lorsque le taux d'AHL atteint un seuil critique, les AHL se lient à la protéine régulatrice. Le complexe ainsi formé active la transcription de plusieurs facteurs de virulence *(Ploy, 2012).*

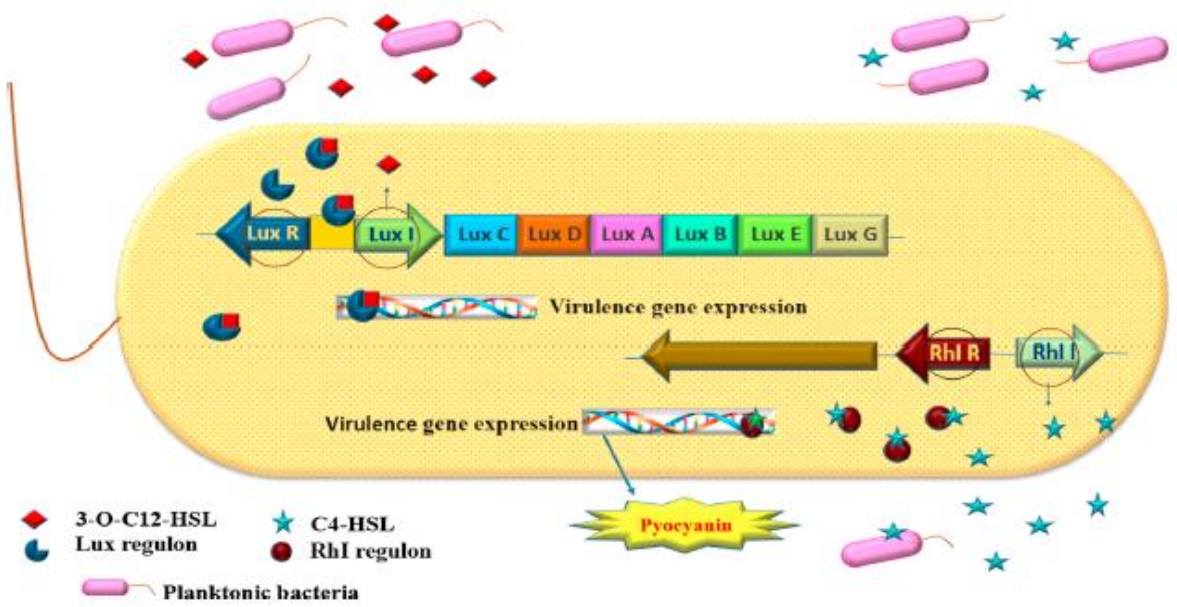


Fig. 11. Mécanisme de quorum sensing de *P.aerginosa (Ploy, 2012).*

1.2.8 QUELQUE INHIBITEUR DE MECANISME DE RESISTANCE

De nombreuses études sont en cours pour trouver de nouvelles substances capables d'inverser la résistance bactérienne ,Plusieurs composés isolés de plantes, ainsi que des extraits et des huiles essentielles, ont montré de bons résultats en ce qui concerne l'inhibition de ces mécanisme *(Mikulášová et al., 2017)* Parmi ces substances, Les acides phénoliques peuvent souvent être identifié dans les aliments Les plus couramment trouvés Caffeic acide et L'acide gallique aussi des nouveaux inhibiteurs Dérivés des Tetrahydropyridine néanmoins des Composés d'origine végétale obtenus à partir de les métabolites précisément la synthèse du secondaire métabolites ainsi que **7**-Trihydroxyflavone (TF) *(Mikulášová et al., 2017)*

1.2.8.1 ACIDE CAFEIQUE

L'acide caféique (acide 3,4-dihydroxy-cinnamique) est un composé organique et un puissant antioxydant. Il se trouve naturellement dans une large gamme de plantes.

L'acide caféique est un type de poly phénol, une classe d'oligo-éléments connus pour leurs propriétés antioxydants. L'élément nutritif prétend avoir de nombreux avantages pour la santé, y compris les capacités anti-inflammatoires, anti-cancer et antiviraux. Dans notre étude l'acide caféique est utilise comme un inhibiteur aux efflux pumps staphyloccocus, *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).*

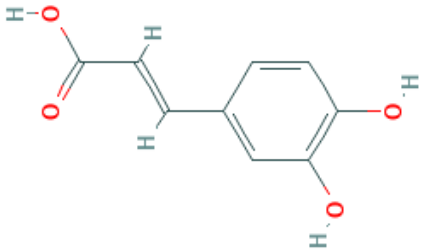


Fig. 12. Structure 2D de l'acide caféique, *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).*

1.2.8.2 ACIDE GALLIQUE

Également appelé acide 3, 4,5-trihydroxybenzoïque, l'acide gallique est un isomère de l'acide trihydroxybenzoïque. Ce composé organique aromatique est naturellement présent dans les plantes et les arbres. Considéré comme un acide phénolique, cet élément entre également dans la catégorie des acides hydroxybenzoïques. Caractérisé par sa formule $C_6H_2(OH)_3COOH$, l'acide gallique produit des esters et des sels nommés gallates. En médecine, il est particulièrement employé pour ses propriétés anti oxydantes et pro-oxydantes, son activité anti tumorale ainsi que pour ses caractéristiques antibactériennes, *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).*

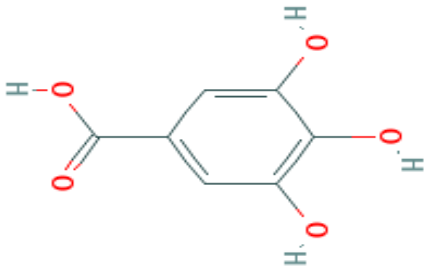


Fig. 13. Structure 2D de l'acide gallique, *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).*

1.2.8.3 TETRAHYDROPYRIDINE

Tétrahydropyridine c'est un composant aromatique de formule moléculaire générale $C_9H_{16}N_2O_6$, tétrahydropyridines ont présenté des propriétés telles que la régulation du débit des ions calcium, étant candidats comme inhibiteurs de l'efflux chez E.coli *(Lande Silva et al., 2017)*

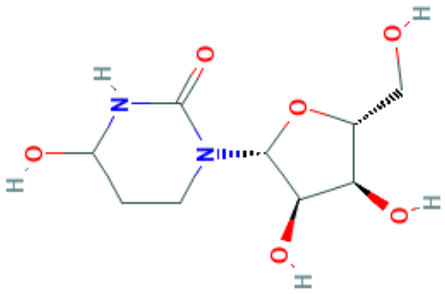


Fig.14. Structure 2D de Tétrahydropyridine, *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).*

1.2.8.4 TRIHYDROXYFLAVONE (TF)

Est un 7-hydroxyflavonol avec des groupes hydroxy supplémentaires aux positions 3 et 5 respectivement, Il est considéré comme un composé organique qui caractérisé par la formule $C_{15}H_{10}O_5$, Il a un rôle inhibée la croissance des cellules tumorales du sein et considéré comme d'agent antimicrobien, qui a été extrait par un arbre tropical à feuilles persistantes appelé Alstonia scholaris, originaire du sous-continent indien et de l'Asie du Sud-est *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).*

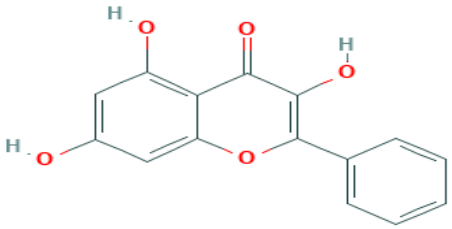


Fig.15. Structure 2D de Trihydroxyflavone, *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).*

1.2.9 ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES

La détermination de la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques est réalisée par l'antibiogramme qui évalue l'inhibition de la croissance bactérienne.

1.2.9.1ANTIBIOGRAMME

C'est la détermination des CMI d'un groupe d'antibiotiques vis-à-vis d'un germe isolé chez un patient. Ce test a pour but de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques connus dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et à l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles ou acquises *(Calgagno et al. .2011).*

1.2.9.2 METHODES D'ANTIBIOGRAMME

La CMI est un bon prédicateur de l'efficacité d'un antibiotique sur une espèce bactérienne par réalisation d'un antibiogramme, et plusieurs méthodes de détermination de la CMI existent :

A. METHODE PAR DILUTION EN MILIEU SOLIDE

Consiste a l'incorporation d'un ATB dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose est ensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation pendant 24h à 37°C, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique. La méthode est réalisée avec une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2 *(Calgagno et al. .2011).*

B. METHODE PAR DILUTION EN MILIEU LIQUIDE

Consiste à mesurer des (CMI) et à les comparer à des concentrations critiques. Elle est réalisée soit en macro méthode, soit en micro méthode**, Détermination** de la concentration minimale inhibitrice. Haut : par macro dilution en milieu liquide. La CMI correspond à la concentration de l'antibiotique contenue dans le premier tube resté limpide après 24 h d'incubation avec la bactérie. Cette méthode, de référence, ne permet de tester qu'un antibiotique par gamme. Bas : par micro dilution en plaque. Chaque ligne de la plaque correspond à un antibiotique. La CMI est donnée par la première cupule (rouge) dans laquelle la croissance de la bactérie a été inhibée *(Calgagno et al. .2011).*

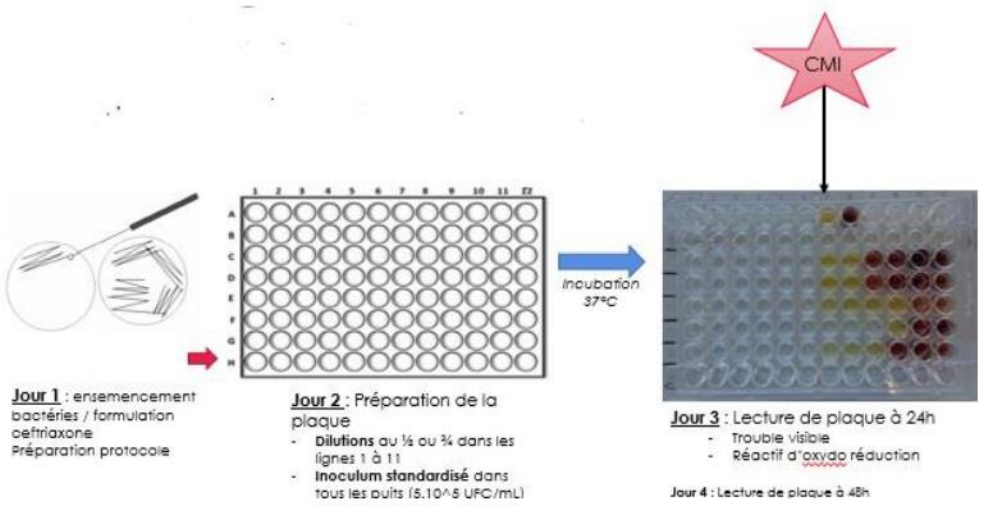


Fig. 16 . Méthode de dilution en milieu liquide *(Calgagno et al. .2011).*

C. DIFFUSION EN MILIEU

Permet de mesurer des diamètres d'inhibition de la croissance d'une bactérie autour d'un disque imprégné d'antibiotique et de les comparer à des diamètres critiques. Des bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique sont déposées sur une gélose préalablement ensemencée par une culture bactérienne. Après incubation la CMI peut être lue sur la zone de lecture directe de la CMI *(Calgagno et al ., 2011.).*

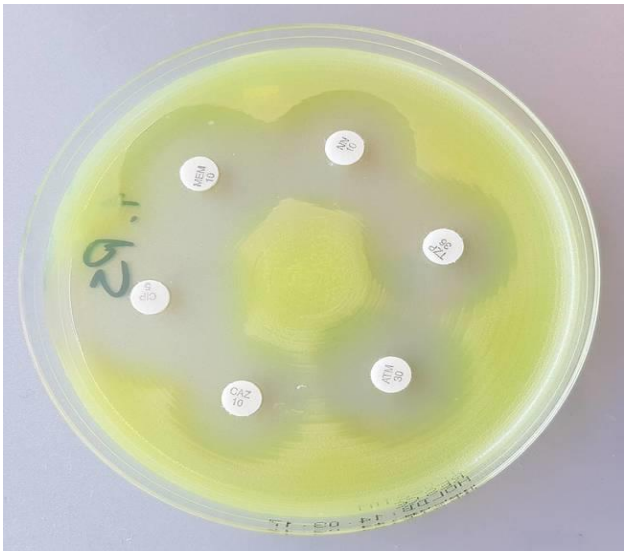


Fig. 17. Diffusion en milieu gélosé *(Calgagno et al ., 2011.).*

1.2.10 CRITERES DE CATEGORISATION DE L'ANTIBIOGRAMME

L'antibiogramme permet la classification en catégories cliniques de résistance d'une souche bactérienne aux ATB. En effet, une souche bactérienne peut être classée sensible (S),

intermédiaire (I), ou résistante (R) pour un antibiotique donné selon les concentrations critique

1.2.10.1 SENSIBLE

Si la CMI mesurée est en deçà de la concentration critique basse.

1.2.10.2 RESISTANTE

Si elle est supérieure à la concentration critique haute, elle est décrétée résistante.

1.2.10.3 INTERMEDIAIRE

Si la CMI entre la CMI résistante et la CMI sensible. *(Calgagno et al ., 2011.).*

Ø mesuré ≥ D(CCinf)	Sensible (S)
Ø mesuré < d(CCsup)	Résistant (R)
d(CCsup) ≤ Ø mesuré < D(CCinf)	Intermédiaire (I)
Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition (Ø mesuré) et le comparer aux diamètres des concentrations critiques inférieure et supérieure (d(CCsup) et D(CCinf))	

Fig. 18 . Critère de la lecture antibiogramme *(Calgagno et al ., 2011.).*

1.2.11 SYNERGIE DES ANTIBIOTIQUES

Outre le fait que certaines molécules inhibent ou au contraire exacerbent l'effet des antibiotiques (acide, sucre, thymine, etc.), les différents antibiotiques peuvent interagir entre eux. Trois grands types d'interactions peuvent être définis :

- **LA SYNERGIE**: chaque antibiotique voit son action augmentée par l'autre.
- **L'ANTAGONISME**: les effets des deux antibiotiques se contrarient.
- **L'INDIFFERENCE**: que l'on utilise chaque antibiotique séparément ou en association, le résultat est le même. (https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/risque-des-medicaments)

1.3 IN SILICO

1.3.1. BIOINFORMATIQUE

La recherche en biologies ne reste plus seulement *in vivo* (en vie) ou *in vitro* (en éprouvette) grâce a le développement de la technologies et la création de l'informatique, les scientifiques ont réussi d' utilise ce dernier pour l'analyse des séquence biologique et prédire la structure et les fonction des molécules sous le termes « la bioinformatique » *(yang, 2014).*

La bioinformatique ou La biologie computationnelle *(yang, 2014).* Apparue dans les années 1960, elle étudie les séquences d'ADN et sur le repliement des protéines, donc travaille surtout au niveau moléculaire *(IMBS D, 2015,).* Elle s'intéresse particulièrement au rapport entre la structure, la dynamique des macromolécules et leur fonction biologique *(yang, 2014),* qui recouvre l'ensemble des technologies et des méthodes permettant de collecter, de stocker, d'analyser et d'interpréter les données biologiques *(vert, 2013).*

Comme le décrit très bien Jean-Michel Claverie : "La bioinformatique est constituée par l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation de l'information génétique (séquences) et structurale (repliement 3-D). C'est le décryptage de la bio-information, la bioinformatique est donc une branche théorique de la Biologie. Son but, comme tout volet théorique d'une discipline, est d'effectuer la synthèse des données disponibles, d'énoncer des hypothèses généralisatrices, et de formuler des prédictions *("computational Biology" 2000)*

1.3.2 INHIBITION IN SILICO

In silico c'est un modèles biomathématiques utilisant des bases de données issues d'expérimentation *in vivo* ou *in vitro*, permettant d'analyser, grâce à des logiciels informatiques, les propriétés recherchées ou indésirables d'une substance en fonction de sa structure ou de sa réactivité, et de raccourcir les temps de recherche *(gallezot g, 2002)*, alors l'inhibition *in silico* c'est l'utilisation de ces logicielle pour arrête un action d'un protéine grâce a des molécules ont un structure 3D joue le rôle d' antibiotique ou un dérive de l'antibiotique *(gallezot g, 2002)*.

1.3.3 CRIBLAGE VIRTUEL

Le criblage virtuel c'est un processus assimilé à un entonnoir qui permet de cribler un ensemble des molécules généralement entre cent mille et dix millions sur une cible pour l'obtenir , à l'aide d'un algorithme de criblage, un nombre gérable de petites molécules organiques quelques dizaines à quelques milliers capable d'inhiber une macromolécule comme cible spécifique *(Tondiet et al., 1999)*, qui seront ensuite testés expérimentalement dans le but d'élimine les molécules indésirables ou inactif tout en priorisant les composés les plus susceptibles d'être actifs *(Tanrikulu et al., 2013).*

Le criblage virtuel est défini comme l'évaluation automatique de très grandes banques de composés à l'aide de programmes informatiques, il se référé à une série in-silico *(parida et al., 2013).* Ce terme fait référence au silicium, matériel principal retrouvé dans les puces informatiques de tous les ordinateurs par l'utilisation des bases de données issues d'expérimentation *in vivo* ou *in vitro* (*gallezot, 2002)* permettant d'analyser, grâce à des logiciels informatiques, les propriétés recherchées ou indésirables d'une substance en fonction de sa structure ou de sa réactivité, et de raccourcir les temps de recherche (*gallezot, 2002)* Il aide à la découverte de nouveaux médicaments et de déterminer de nouveaux composés les plus susceptibles pour se lier à une molécule cible présentent d'une structure 3D connue *(parida et al., 2013).*

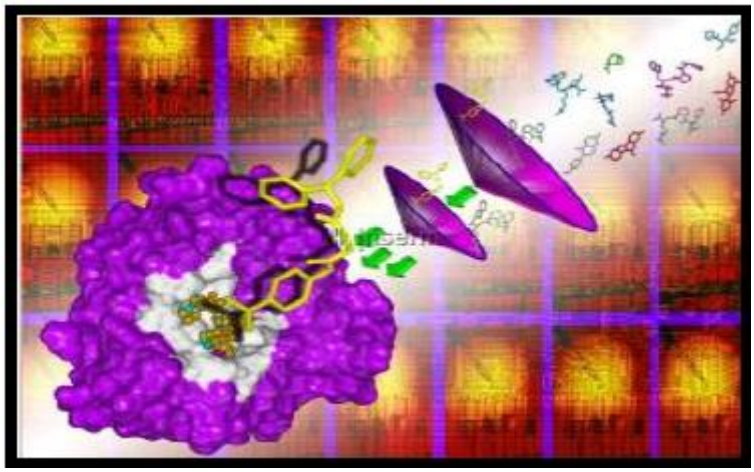


Fig. 19. Criblage Virtuel in-silico *(http: // serimedis. inserm. fr*)

1.3.4 CRIBLAGE PAR DOCKING MOLECULAIRE

Le docking moléculaire (ancrage / l'amarrage/ arrimage) est une méthode informatique *(françois, 2012),* le plus utilise *in silico*, apparus au début des années 1980 *(journal of molecular biology. 1982),* qui permet de prédire les interactions probable entre ligand et les acides amines d'une protéine *(merzougue, 2012).*

Le docking moléculaire permet de prédit la conformation entre «ligand-protéine» ou «protéine-protéine» et la structure intermoléculaire entre les deux qui ont une structure tridimensionnelle 3D, et prédit aussi les modes de liaison ou les conformations la plus favorable d'un ligand à un récepteur avec d'évaluation des interactions énergétiques potentielles entre le ligand et la protéine. *(chikhi a, 2007)*

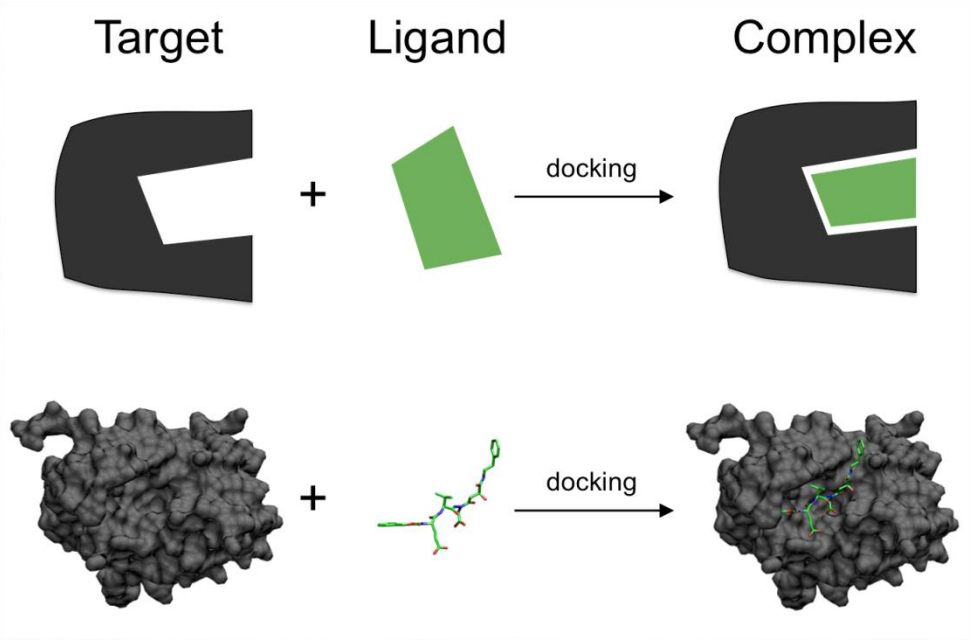


Fig .20. Représentation schématique du Docking de deux molécules. Protéine. Ligand. Complexe moléculaire. *(Laurent Hoffer, 2013)*

1.3.5 OUTILS DE DOCKING

Il existe quelque outille pour le docking moléculaire :

1.3.5.1 PROGRAMMES

Plus de 30 programmes de Docking moléculaire (commerciaux ou non) sont disponibles *(Grosdidier, 2013),* le conception d'un logiciel de docking est applications dans la recherche de nouvelles molécules actives.*(merzoug , 2012).*

Les plus fréquemment des programmes sont cites respectivement :

- AutoDock (27 %) ;
- GOLD (15 %) ;
- FlexX (11 %) *(Sousa et al., 2006).*

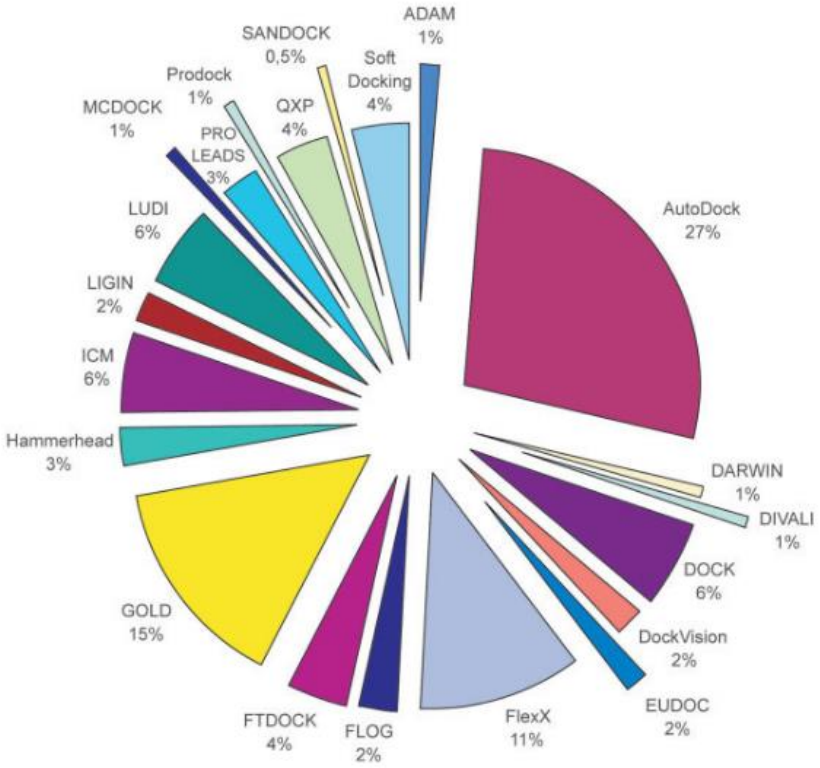


Fig .21. Les programmes de docking les plus cités d'après *(Sousa et al., 2006).*

Le tableau suivant indique neuf programmes permet le docking moléculaire, ADT c'est le programme gratuit le plus utilisable chez les rechercher scientifique et même les étudiants.

Tableau 1.1 principaux programmes de Docking moléculaire.(*Taylor et al., 2003)*

Nom	Editeur	Site internet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX
Fred	OpenEyse	http://eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html/
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

A. AUTODOCK

AutoDock ou ADT c'est un programme de docking moléculaire dans le but analyse l'interaction entre un ligand et une protéine cible dans le site spécifique ce site actif et permet à prédire la conformation la plus favorable d'un ligand au sien de son récepteur. Ce logiciel est distribué avec une suite d'outils graphiques pour préparer les expériences de criblage virtuel, ainsi que plusieurs tutoriels, améliorant ainsi son accessibilité.
(lokesh ravi et al ., 2016)



Fig. 22. Logo de logicielle ADT *(lokesh ravi et al ., 2016)*

ADT est consiste deux programme clé : Autogrid4 et AutoDock 4

- **AUTOGRID4**

Qui prépare une grille des acides aminés présents dans la GridBox définie par l'utilisateur.

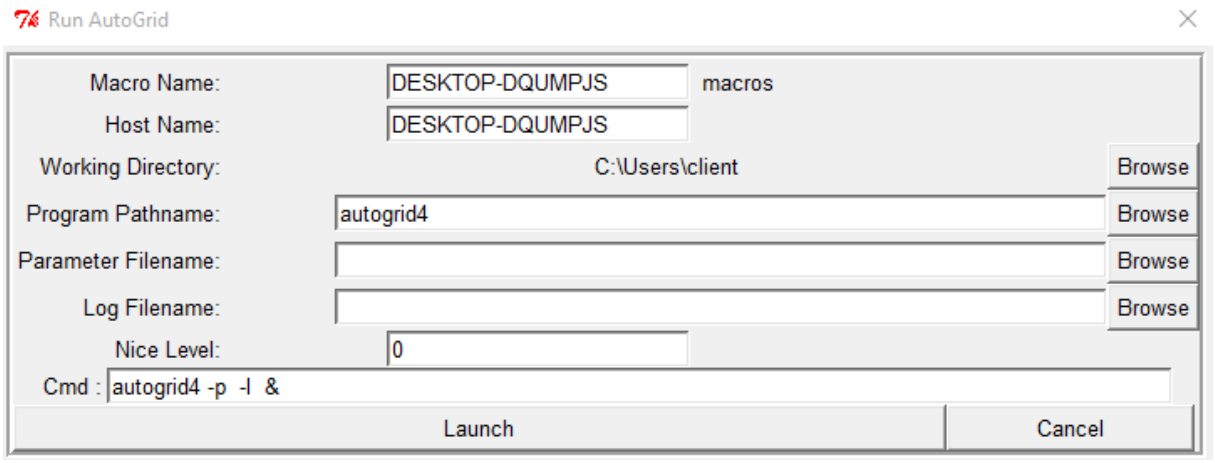


Fig. 23. Capture d'écran programme AUTOGRIDE *(lokesh ravi et al ., 2016)*

- **AUTODOCK4**

Qui permet d'analyse l'interaction entre la protéine (récepteur) et le ligand.

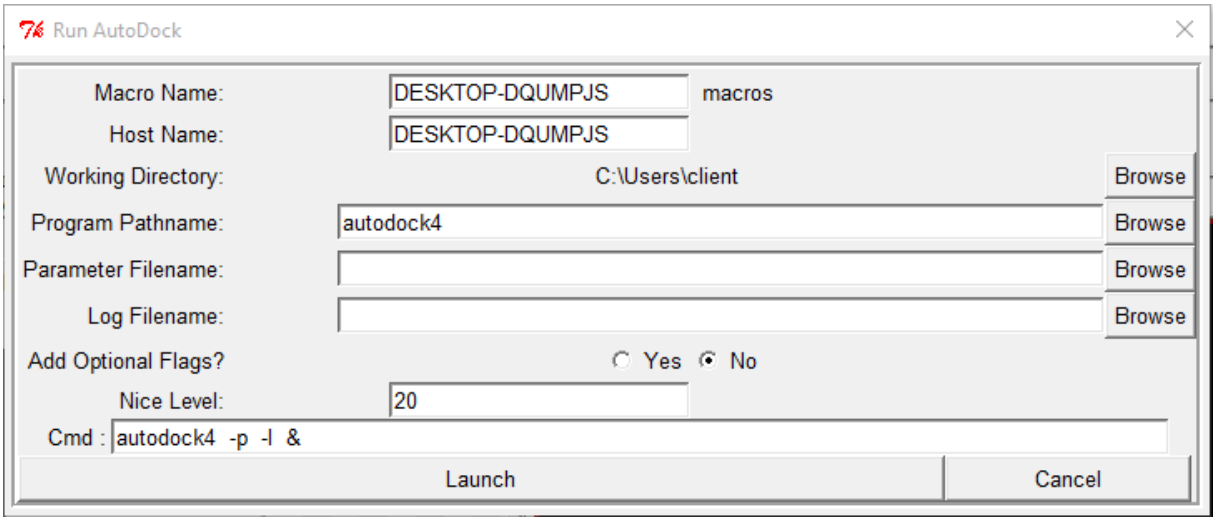


Fig. 24. Capture d'écran programme AUTODOCK4 *(lokesh ravi et al ., 2016)*

B. AUTODOCKTOOLS

AutoDockTools, ou ADT, c'est un logicielle et un interface graphique gratuite pour AutoDock le plus utilise, il développée par un institue « the scripps reaserche institute », ce logicielle permet de :

1. Prépares les fichiers de coordination « récepteur et ligand » ;
2. Calcules l'affinité des atomes avec AutoGrid ;
3. Docking le ligand avec AutoDock :

4. l'analyse des résultats. *(lokesh ravi et al ., 2016)*

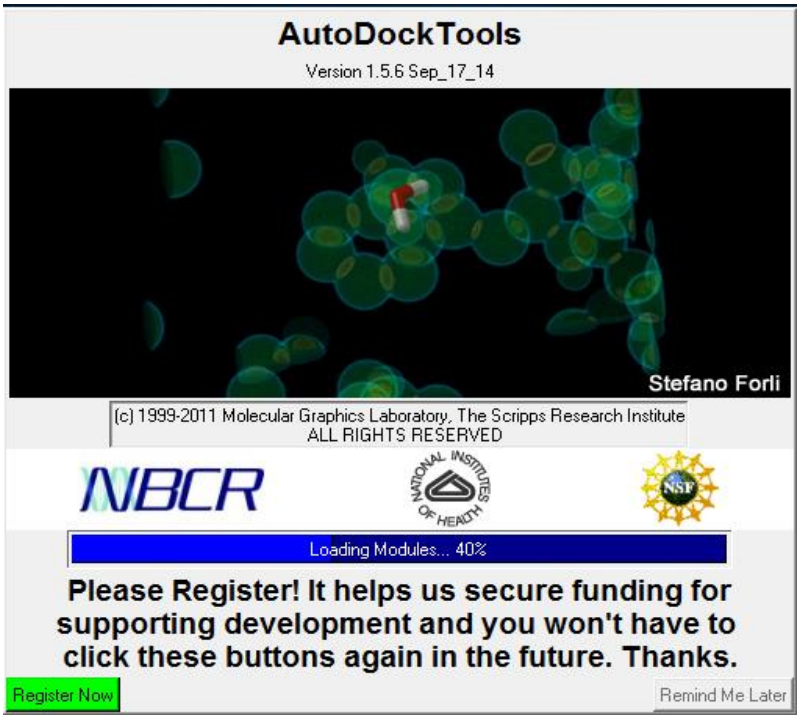


Fig. 25. Capture d'écran ADTtools

1.3.5.2 RECEPTEUR

Un récepteur est un organe, une cellule ou une molécule qui assure la réception d'information. Dans le cas d'une molécule, le récepteur est une protéine spécialisée capable de se lier spécifiquement et réversiblement à une autre molécule appelée ligand. Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la PDB « Protein Data Bank » *(Martin L,2006).*

1.3.5.3 LIGAND

Ligand est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal. (*Shibata,et al., 2016)*

En Docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules. Monge A. Création et utilisation de chimio thèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs. *(Orléans,2006* **)**

CHAPITRE 2. MATERIELS & METHODES

CHAPITRE 2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES

2.1 ETUDE *IN VITRO*

Le nombre des souches bactériennes Présentent dans les isolats cliniques résistants à plusieurs ATB sont en augmentation par des mécanismes de résistance comprennent des changements dans la formation des biofilm, l'inactivation par des enzymes, des altérations de la cible et des efflux.

Parmi les souches bactériennes la plus résistants *E .coli, Staphylococcus aureus et P.aeruginosa.* D'autre part des nombreuses études est en cours pour trouver des nouvelles substances capables d'inverser et inhibé la résistance de ces souches bactérienne par l'inhibition de ses mécanismes de résistants. (joycy et *al*., 2018).

2.1.1 INHIBITION DE S. AUREUS RESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES

S.aureus a été signalé comme l'un des plus difficulté à traiter. Dans la recherche d'inhibiteurs de sa résistance, des substances végétales isolées telles que les composés phénoliques ont démontré leur capacité à inverser la résistance de *S.aureus* par efflux pompe. les composés phénoliques acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) et l'acide gallique tanin (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) est les principaux inhibiteurs de efflux pompes de ce bactérie(joycy et *al*., 2018).

2.1.2 INHIBITION D'E.COLI RESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES

Une multi résistance émerge dans plusieurs souches bactériennes cliniquement importants, efflux pompes est un mécanisme important de résistance aux ATB chez *E. coli* .son système AcrAB-TolC présent dans *E. coli* se compose d'une protéine de transport (AcrB), d'une protéine (TolC) qui forme et d'une protéine adaptatrice (AcrA).Des tétrahydropyridines capables d'inhiber l'efflux pourraient être utilisées comme adjuvants aux ATB ou pour empêcher l'acquisition d'un autre mécanisme de résistance (Lande Silva et al., 2017)

2.1.3 INHIBITION DE P.AERGINOSA RESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUE

P. aeruginosa est capable de vivre soit à l'état planctonique soit à l'état sessile fixé à un support ce mode de vie appelé biofilm. La population de biofilm se produit par le processus d'interaction de cellule à cellule par la dispersion de molécules de signalisation sont

communément appelées système de détection de quorum sensing ce mode de vie est considéré comme mécanisme de résistance chez *P. aeruginosa*.

Trihydroxyflavone (TF) d'extrait de feuille d'A. Scholaris est consisté a l'inhibition de la formation de biofilm et l'activité de détection du quorum sensing chez *P. aeruginosa* ses effets est isolé sur la production de facteurs de virulence régulés par quorum sensing *(OM et al,. 2010)*

2.2 MATERIALS

TABLEAUX 2.1. Matériels utiliser in vitro

Bacteries	**E-coli**	**Staphyloccocus aureus**	**Pseudomonas Aeruginosa**
Inhibiteur	Tétrahydropyridine	Acide caféique, acide gallique.	3, 5, 7-Trihydroxyflavone de alstonia scholaris
Milieux de culture	Luria-Bertani (LB)	Heart Infusion Agar (HIA), Brain Heart Infusion (BHI), gélose au sang.	Bouillon nutritif, milieux sélectifs
Reactifs	Méthanol, l'eau distillée	Résazurine : indicateur coloré. DMSO (Diméthylsulfoxyde). L'eau pour la dilution. Glycérol.	Méthanol, l'eau distillée

2. 3 METHODES

Les méthodes de l'inhibition de chaque bactéries et d'après la littérature

2.3.1 ESCHERICHIA COLI

2.3.1.1 DETERMINATION DE LA CMI

Pour la diffusion de disque, on été utilisé maximum 12 disques sur une plaque de 150 mm et pas plus de 6 disques sur une plaque de 100 mm; les disques doivent être espacés d'au moins 24 mm, centre à centre. Chaque diamètre de zone doit être clairement mesurable ; les zones qui se chevauchent empêchent une mesure précise.

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition complète (à l'œil nu), y compris le diamètre du disque. Tenez la plaque de Pétri à quelques centimètres au-dessus d'un fond noir éclairé par une lumière réfléchie.

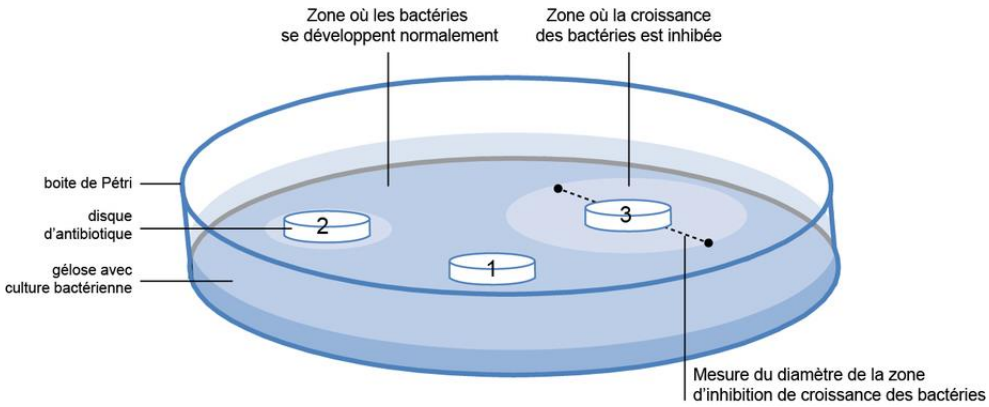


FIG.2.1. Méthode de diffusion de disque

2.3.2 STAPHYLOCOQUE AUREUS

2.3.2.1 PREPARATION DES SUBSTANCES

L'acide caféique, l'acide gallique ont été préparés selon le CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) *(Wayne , 2012.)*

Les substances ont été diluées dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde)avec 10 mg / mL et puis dilué dans l'eau, en diminuant la concentration à 1024 µg / mL et pour**EtBr** a été dilué uniquement dans l'eau. (Joycy et al ., 2018)

2.3.2.2 PREPARATION ET STANDARDISATION DE L'INOCULUM

Les bactéries ont été déjà conservés sur gélose au sang puis transféré et maintenu en deux stocks, un en glycérol à -80 ° C et l'autre en Heart Infusion Agar Inclinée (HIA) à 4 ° C.

Ensuit a partir les stocks préparé qui cultivées les bactéries à nouveau sur de la gélose Heart Infusion solide inclinée en utilisant la méthode standard et incubée à 37 ° C pendant 24h.
Dérivant de ce milieu solide, l'inoculum ont été réalisés en utilisant le test tubes contenant une solution saline stérile qui ont été normalisés selon à l'échelle McFarland0,5 correspondant à 106 UFC (Colonie Unité de formation). . (Joycy et al ., 2018)

2.3.2.3 TESTS DE CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI)

D'après le littérateur, les substances était prépare dans un eppendorfs, ont était utilise 900 µL de milieu de culture BHI avec 100 µL de l'inoculum puis transfert sur une plaque de micro dilution à 96 puits, 100µL a chaque puis ont été micro dilués jusqu'à le derniers puits qui permet de contrôle de croissance bactériennes.
La lecture a été réalisée après 24 h par visualisation du changement de couleur du milieu par l'ajout de 20 µL de résazurine (7-hydroxy3H-phénoxazine-3-one 10-oxyde). Le changement de couleur du support de bleu à rouge indique la présence d'une croissance bactérienne, tandis que la présence de la couleur bleue indique l'absence de croissance. (Joycy et al ., 2018)

2.3.2.4 TESTS D'INHIBITION DE LA POMPE A EFFLUX PAR REDUCTION DE LA CMI DU BROMURE D'ETHIDIUM ET LA CMI DE L'ANTIBIOTIQUE

(Même protocole de micro dilution)
La lecture était faite après 24h, le changement de couleur bleu au rouge indique la présence de croissance bactérienne
La couleuse bleue indique l'inexistence de croissance bactérienne.

La diminution de la CMI du bromure d'éthidium ou la présence d'ATB spécifiques dans les souches porteuses d'une pompe à efflux est une caractéristique d'inhibition de la pompe d'efflux (joycy et *al*., 2018).

2.3.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

2.3.3.1 EXTRACTION ET ISOLEMENT DU COMPOSE BIOACTIF DE LA FEUILLE D'A. SCHOLARIS

Après recueillir les Feuilles fraîches d'Alstonia Schoris ont été lavé avec l'eau distillée puis ombre, séchée et finement poudrée pour plus Analyse. La poudre de feuilles a été extraite au méthanol et séparé de la fraction flavonoïde.
Cette fraction a été purifiée, isolé le composé bioactif qui identifié par la méthode de spectroscopie.



Fig.2.2. Feuilles d'Alstonia Schoris *(OM et al,. 2010)*

2.3.3.2 PREPARATION DE P.AERUGINOSA

La souche bactérienne lyophilisée a été inoculée dans bouillon nutritif et milieux sélectifs pour la croissance et incubés pendant 48 h à 37 °C. Le stock de glycérine a été maintenu et stocké à 4°C.

2.3.3.3 INHIBITION DE LA FORMATION DE BIOFILM /QS

L'effet du TF isolé d'A. Scholaris est sur la formation de biofilm.

La quantification de la densité de la biomasse du biofilm a été observée sous lecteur de plaque de croitre à 595 nm et le pourcentage d'inhibition du biofilm a été calculé *(OM et al,. 2010).*

Suivant la loi :

% d'inhibition = contrôle de croissance OD Échantillon OD / contrôle de croissance OD 100.

2.3.3.4 DETERMINATION DE L'INHIBITION DE LA FORMATION DE BIOFILM AU MICROSCOPE OPTIQUE

Visualiser l'effet du composé TF isolé pourrait inhiber les bactéries formant un biofilm par microscopie optique.

La lamelle de verre stérile a été immergée dans 5 ml de bouillon LB avec ou sans concentration sous MIC (100 µL/mg) dans des plaques à 6 puits.

Par la suite, ajouter 10µl d'une culture d'une nuit de P.aeruginosa et incuber pendant 48 h à 28° C pour la formation de biofilm sur des lames de verre. Après 48 h d'incubation, les lamelles ont été retirées et lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries planctoniques libres. Les cellules de biofilm adhérentes ont été immergées dans du méthanol pendant 15 min, puis les lamelles ont été colorées avec une solution de cristal violet

à 2% pendant 5 min. Finalement, les lamelles ont été lavées avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les taches en excès et séchées pendant 30 min à 30 °C. Plus tard, les lamelles ont été visualisées au microscope optique *(OM et al,. 2010).*

2.4 ETUDE *IN SILICO*

Nous avons utilisé des logiciels et des site web pour réalise se travail.

2.5 MATERIELS

2.5.1 PROGRAMMES

Nous avons travaillé avec le programme **AutoDock Tools** dans la version la plus récente 4.2 *http://autodock.scripps.edu/resources/adt*, et installé aussi **Avogadro** pour transformer les forme téléchargé en PDB .

2.5.2 BANQUES DE DONNEES ET LES SITES INTERNET

2.5.2.1 PDB (PROTEINE DATA BANK)

La banque de données protéiques (Protein Data Bank) *[http://www.rcsb.org]* est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D des protéines, des acides nucléiques et d'autres macromolécules. (*sussman jl, et al., 1998)*

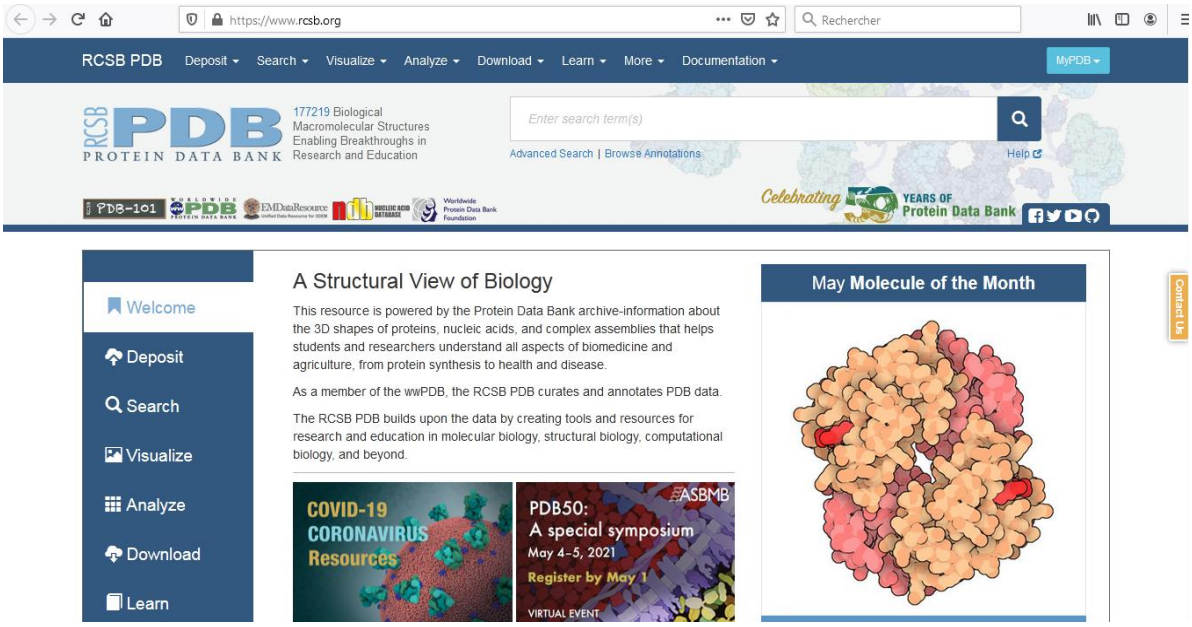


Fig.2.3. Capture d'écran de l'interface de Protein Data Bank *(http://www.rcsb.org)*

2.5.2.2 PUBCHEM

C'est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)*, qui englobe plusieurs millions de composés mis en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres chimique, biochimique, Pharmacologique, production, toxicologie.

(chabbi et al., 2017)

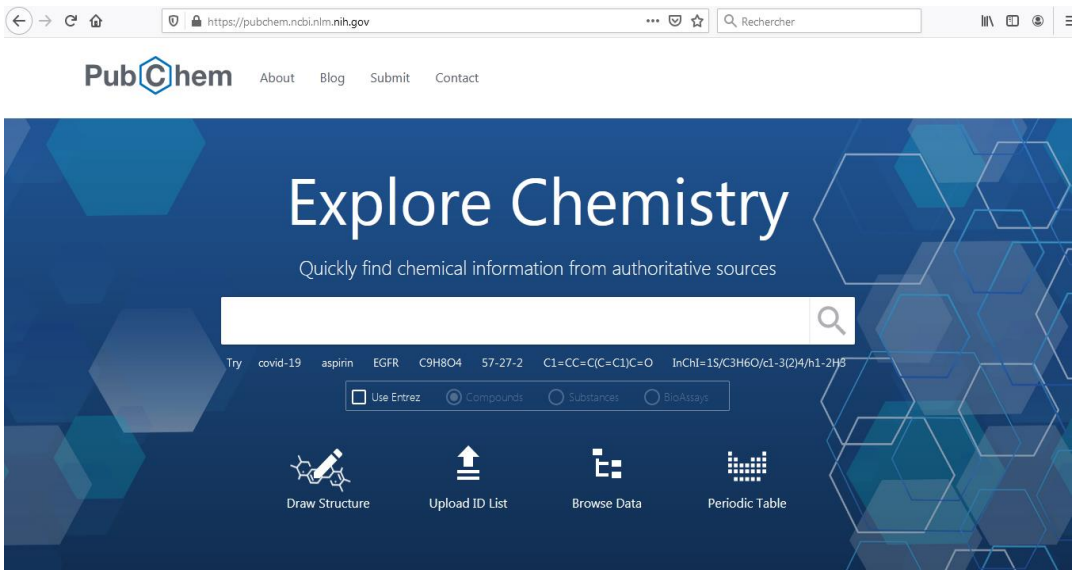


Fig. 2.4. Interface de PubChem *(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)*

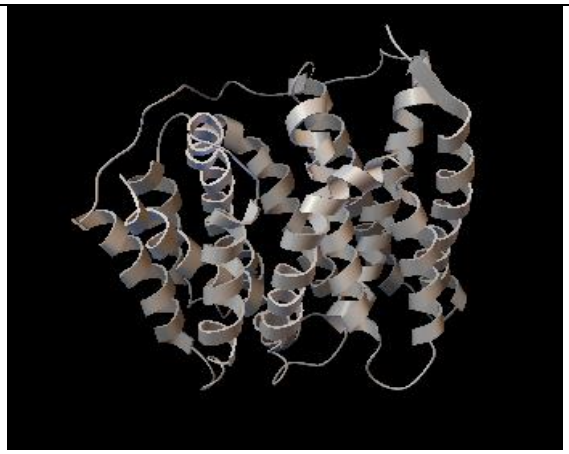
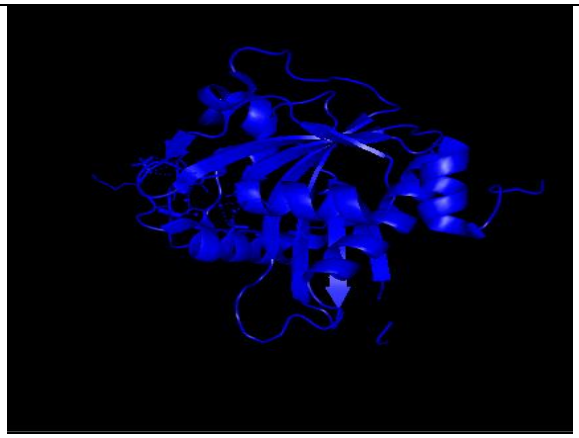
Donc à partir PubChem nous avons téléchargée les ligands que nous avons utilisé sous le format Pdb, mais dans cette site il exige le format mol2 ou le format sdf, Alors nous convertissons au format Pdb à l'aide logiciel **Avogadro.**

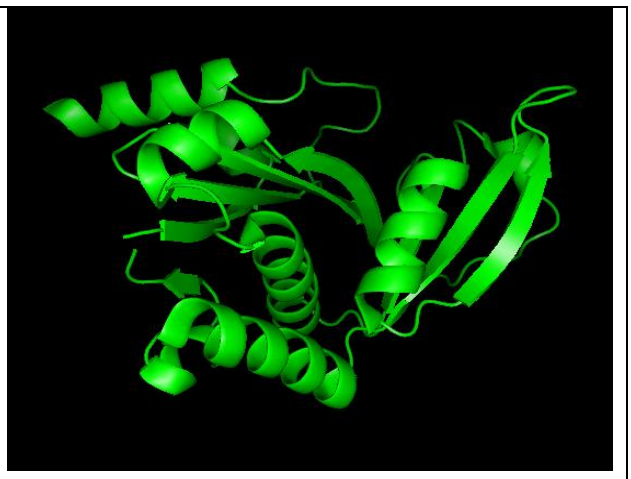
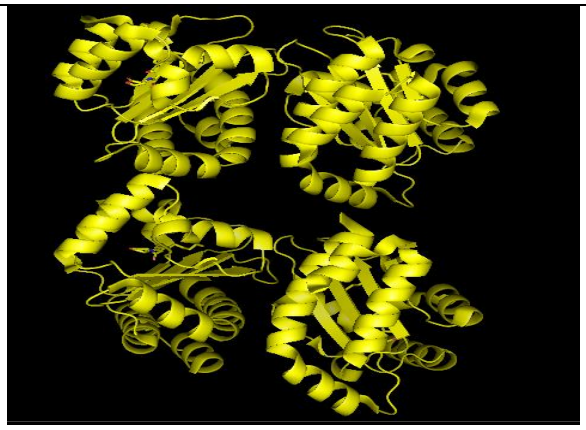
2.5.2.3 RECEPTEURS (LES PROTEINES)

Dans notre travail, nous avons utilisé les protéines sous le format Pdb, elle est téléchargée à partir de la ''Protein Data Bank'' (PDB) en introduisant son code (PDB: 2GFP, 2BR6, 1RO5, 1KZF, 2UVO, 4DX5) .

La protéine 2GFP utilisé pour *S.aureus* : 2BR6, 1RO5, 1KZF, 2UVO pour *Pseudomonas aeruginosa* et 4DX5 pour *Escherichia coli*.

TABLEAU.2.2. Représente la structure **pdb** des protéines utilise dans notre travailles

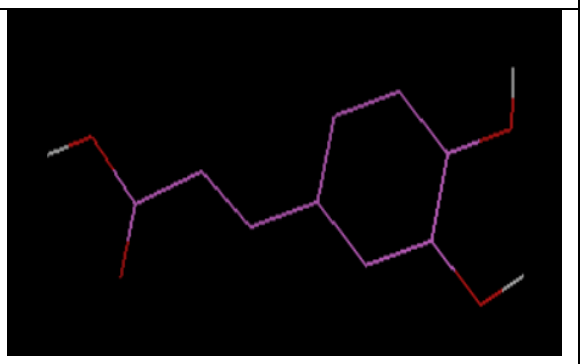
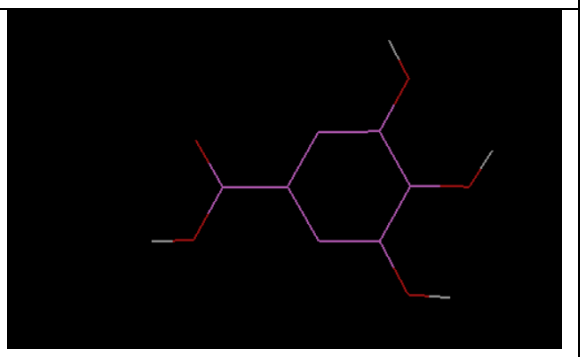
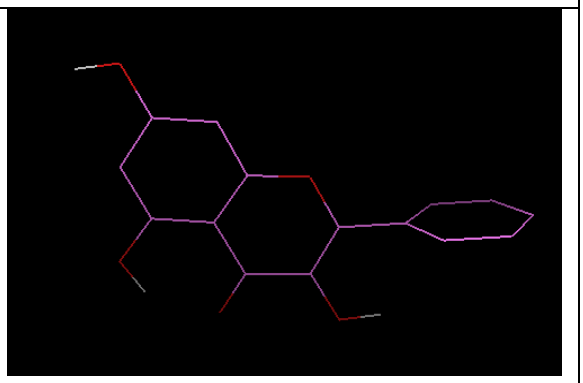
Bactéries	**Pdb**	**Structure 3D**
S. Aureus	2GFP	
P.Auruginosa	2BR6	
	1RO5	

	1KZF	
	2UVO	
E. coli	4DX5	

2.5.2.4 INHIBITEURS UTILISE

Nous avons utilisé différent inhibiteur sous forme PDB pour chaque bactérie, Ils sont indiqués dans le tableau suivant :

TABLEAU.2.3. Structure des inhibiteurs utilisés contre les bactéries étudie

Bactéries	Inhibiteurs utilisés	Structure réalisée par AutoDockTools
E. coli	Tétrahydropyridine	
S. aureus	Acide Caféique	
	Acide Gallique	
P. aeruginosa	3, 5, 7-Trihydroxyflavone de Alstonia Scholaris	

2.5.2.5 PROTEINE PLUS

ProteinsPlus c'est un outil informatique disponible sur le web : *https://proteins.plus/*qui aider les scientifiques à travailler avec les structures protéiques par concentre sur les interactions

protéine-ligand. Parmi ses fonctions Visualisez des structures et créez des représentations de pose 2D. *https://proteins.plus/pages/about*

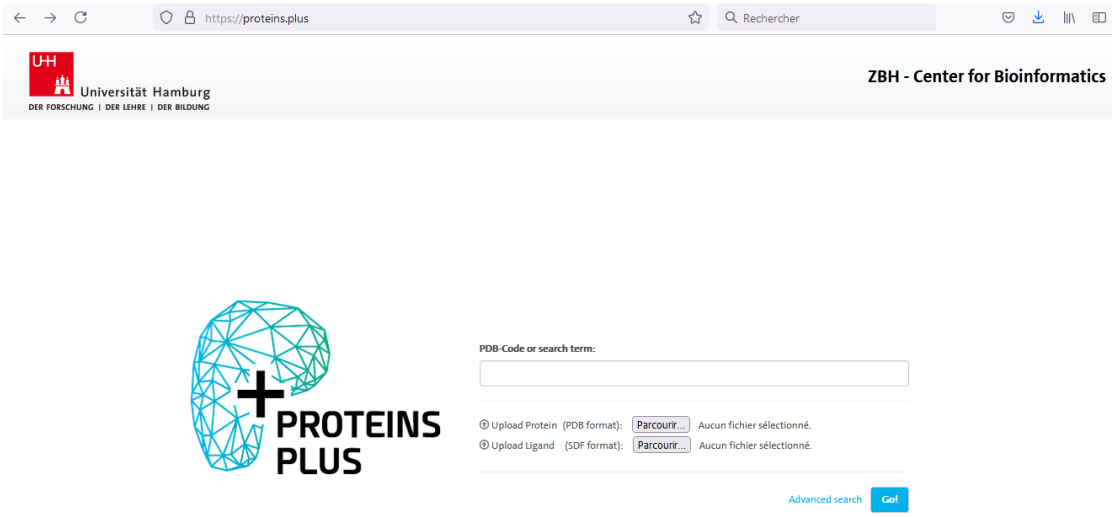


FIG.2.5. Interface de ProteinsPlus *(https://proteins.plus/)*

2.6 METHODES

Les structure 3D des protéines utilise dans notre travaille pour les 3 bactéries (*E.coli*, *P.aeruginosa* et S. aureus) est télécharge a partir 'Protéine Data Bank' et les ligands PubChem. Après avoir extraire ou télécharger les fichiers en pdb, on va lancer l'outil AutoDock Tools (ADT) et suivait les étapes suivant, pour d'avoir meilleur résultat et inhibée les bactéries à partir de obtenir les meilleures interactions et les meilleures positions des inhibiteurs dans les protéines pour trouver un site actif pour une protéine cible, afin d'avoir les conformation avec l'énergie de liaison libre, qui aide à décider quel ligand candidat interagit le mieux avec un récepteur protéine cible.

2.6.1 PREPARATION DE LA PROTEINE

1. **File** → **Read Molécule**, sélectionner la protéine sous forme **pdb** qui déjà téléchargée et cliquer sur **Open.**

2. Certaine les protéines contient plusieurs chaine, donc nous avons choisir la meilleur chaine pour la fixation, et supprimé les chaines qui ne besoin pas par : **Edit** → **Delete** → **Delete Selected Atoms** → **Continue.**

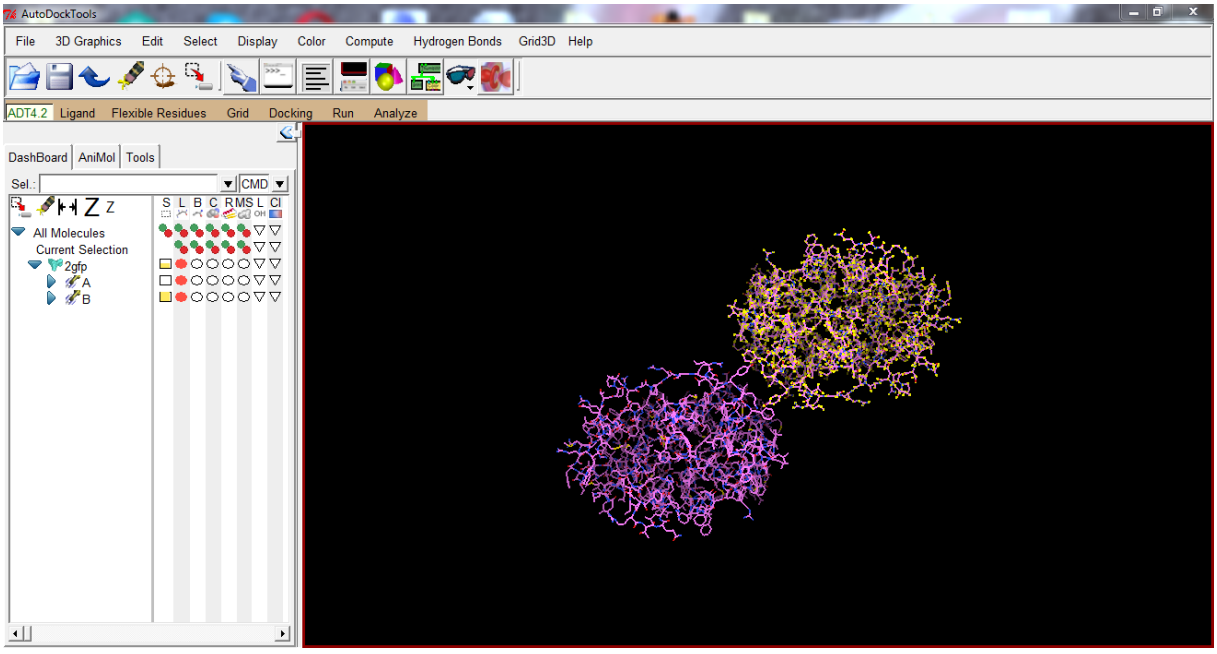


FIG.2.6. Exemple de sélectionné chaine de protéine

3. Retirer l'eau si elle est présente dans la molécule [**Edit→Delete water**] et ajouter l'Hydrogène à la protéine [**Edit→hydrogènes →Add**]

Choisir ajouter **Polar Only** et en utilisant la méthode **No Bond Order,** et cliquez sur **yes** pour renuméroter, ensuit **OK** pour ajouter hydrogènes polaires.

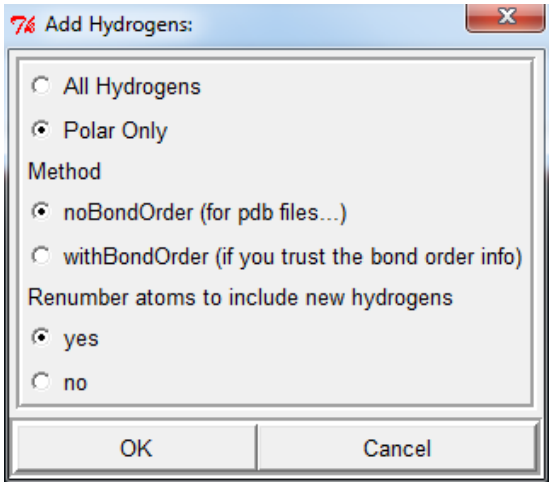


FIG.2.7. Interface pour ajout Hydrogène

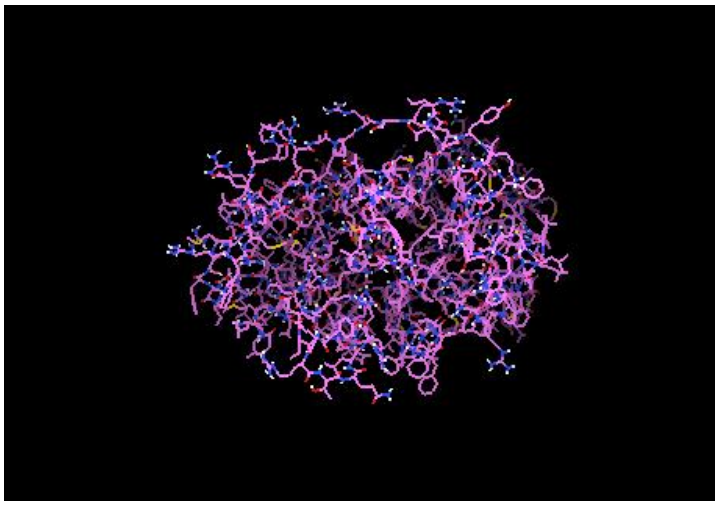


FIG.2.8. Exemple d'ajout hydrogène sur la protéine

4. Ensuite sauvegarder les changements effectués [**File** → **Save** → **Write PDB**] et choisir **Sort Nodes** et cliquer sur **OK.**

2.6.2 PREPARATION D'UN FICHIER LIGAND POUR AUTODOCK

1. **Ligand**→ **Input** →**open (AD3),** choisir ligand utilisé sous format PDB files (*pdb)

2. Ensuit enregistrée le ligand en forme PDBQT [**Ligand**→ **Output** → **Save** en PDBQT(AD3)].

2.6.3 PREPARATION DE MACROMOLECULE

1. **Grid** → **Macromolécule** → **Choose** →**Select Molecule** et enregistrée en **pdbqt.**

2.6.4 PREPARATION DU FICHIER DE PARAMETRES DE GRID

1. choisir le ligand (**Grid→Set MaP Types → Choose ligand → Select ligand**).

2. **Grid→Grid Box.**

Il dispose de 3 widgets de molette qui vous permettent de modifier le nombre de points dans les dimensions x, y et z, pour cela, nous avons changé les paramètres de plan de la grille pour que le plan de la grille soit au centre près de site de liaison, et il doit être assez grand pour contenir tous les résidus qui interagissent avec le ligand et suffisamment grand pour permettre au ligand d'avoir une rotation complète.

3. **File → Close Saving Current**.

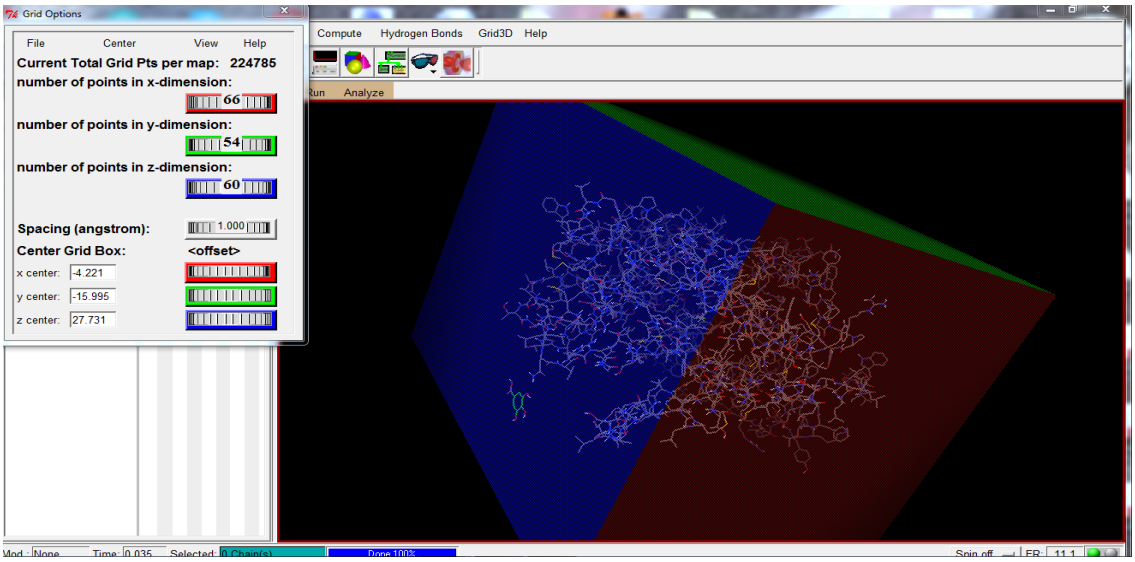


FIG.2.9. capture d'écran représente plan de grill

3. Enregistrée macromolécule en forme gpf [**Grid→ Output →Save GPF** (par exemple : 2gfp.gpf)].

2.6.5 PREPARATION DU FICHIER DE PARAMETRES DE DOCKING (L'AMARRAGE)

1. **Docking → Macromolecule → Set Rigid Filename** et ensuit téléchargée Macromolecule qui déjà enregistrée en forme PDBQT.

2 . Docking → Ligand → choose ligand → select ligand.

3. Docking → Search Parameters → Genetic Algorithme.

4. Docking → Output Lamarckian GA (4,2), Enregistrée en DPF (ligand.dpf).

2.6.6 DÉMARRAGE D'AUTO GRID

1. **Run → Run AutoGrid.**

2. **Program Pathname :**Cliquez sur **Browse** et choisir AutoGrid 4 .

3. Paramètre Filename : click sur **Browser** et entrée de fichier gpf, qui a la suit chargera automatiquement le fichier glg dans **Log Filename .**

4. Et cliquez **Launch.**

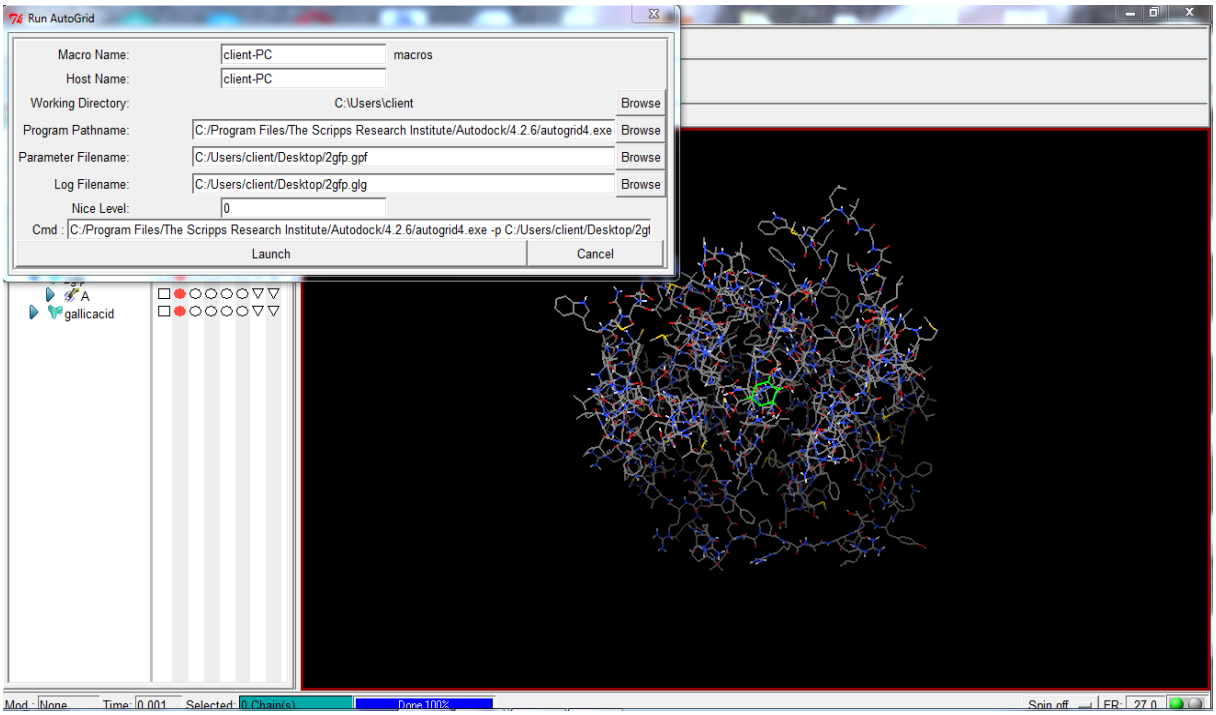


FIG.2.10. Démarrage d'AutoGrid

2.6.7 DEMARRAGE D'AUTO DOCK

1. **Run → Run AutoDock.**

2. Program Pathname : cliquez sur **Browser** et choisir AutoDock 4 .

3. **Paramètre Filename** : cliquez sur **Browse** et entrée de fichier dpf, qui a la suit chargera automatiquement le fichier dlg dans **Log Filename .**

4. Et cliquez **Launch .**

2.6.8 ANALYSE ET LECTURE DES RESULTATS D'AUTODOCK

1. **Analyse → Dockings → Open.**

Cette commande ouvre un fichier navigateur qui vous permet de choisir un fichier que nous voulons analyser avec sous forme dlg.

2 .La construction de liaisons hydrogène nécessite que la molécule réceptrice soit présente dans le spectateur et que vous l'avez choisi soit en utilisant:

Analyse →Macromolécule → Open .

3. Analyse → conformation → Play.

Cela ouvre un Conformation Player (CP) que vous pouvez utiliser pour examinez les conformations ancrées, Le CP a une liste courante de conformations (sa séquence) et un courant liste d'identifiants.

La liste de séquences comprend tous les conformations, triées par exécution. La liste d'identifiants est [0, 1, 2,3… 10].



FIG.2.11. interface de mode de lecture

4. &→ Build H-bonds/show info.

Le bouton Esperluette (&) ouvre le widget Définir les options de lecture (Set Play Options).

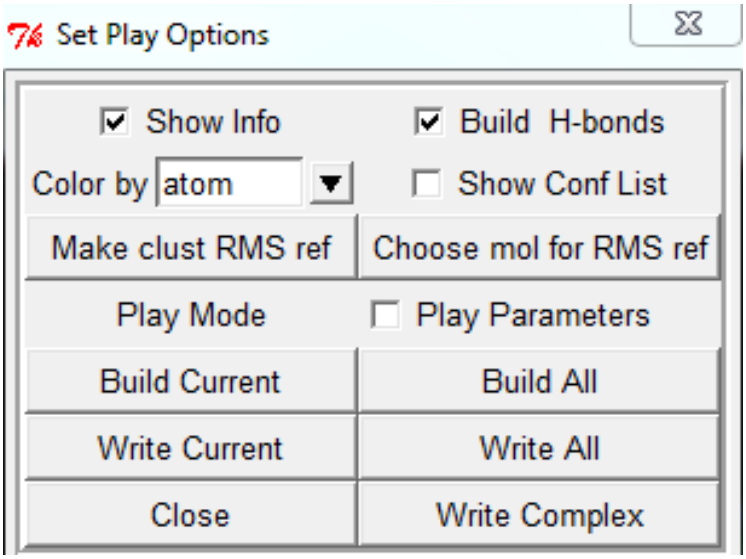


FIG.2.12. Capture d'écran pour les options de lecture

Build H-bonds : allume et éteint le bâtiment et affiche l'hydrogène liaisons entre la macromolécule et le ligand dans son courant conformation.

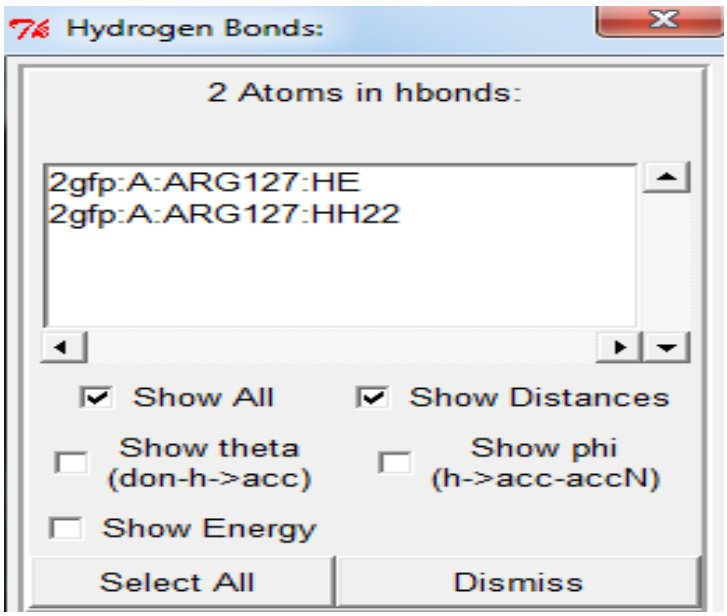


FIG.2.13. Interface de Build H-bonds

Show info : ouvre et ferme un panneau séparé Conformation # Info qui affiche des informations supplémentaires sur la conformation actuelle.

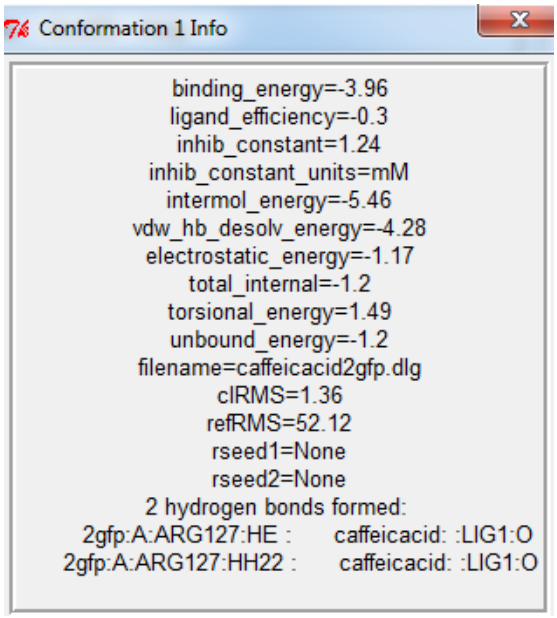


FIG.2.14. Interface de Show info

5. Cliquez sur la flèche blanche vers l'avant qui permet démarrent la lecture l'analyse des résultats du docking.

6. Après avoir terminé avec succès la procédure de docking, les résultats sont enregistré dans un fichier sous forme dlg.

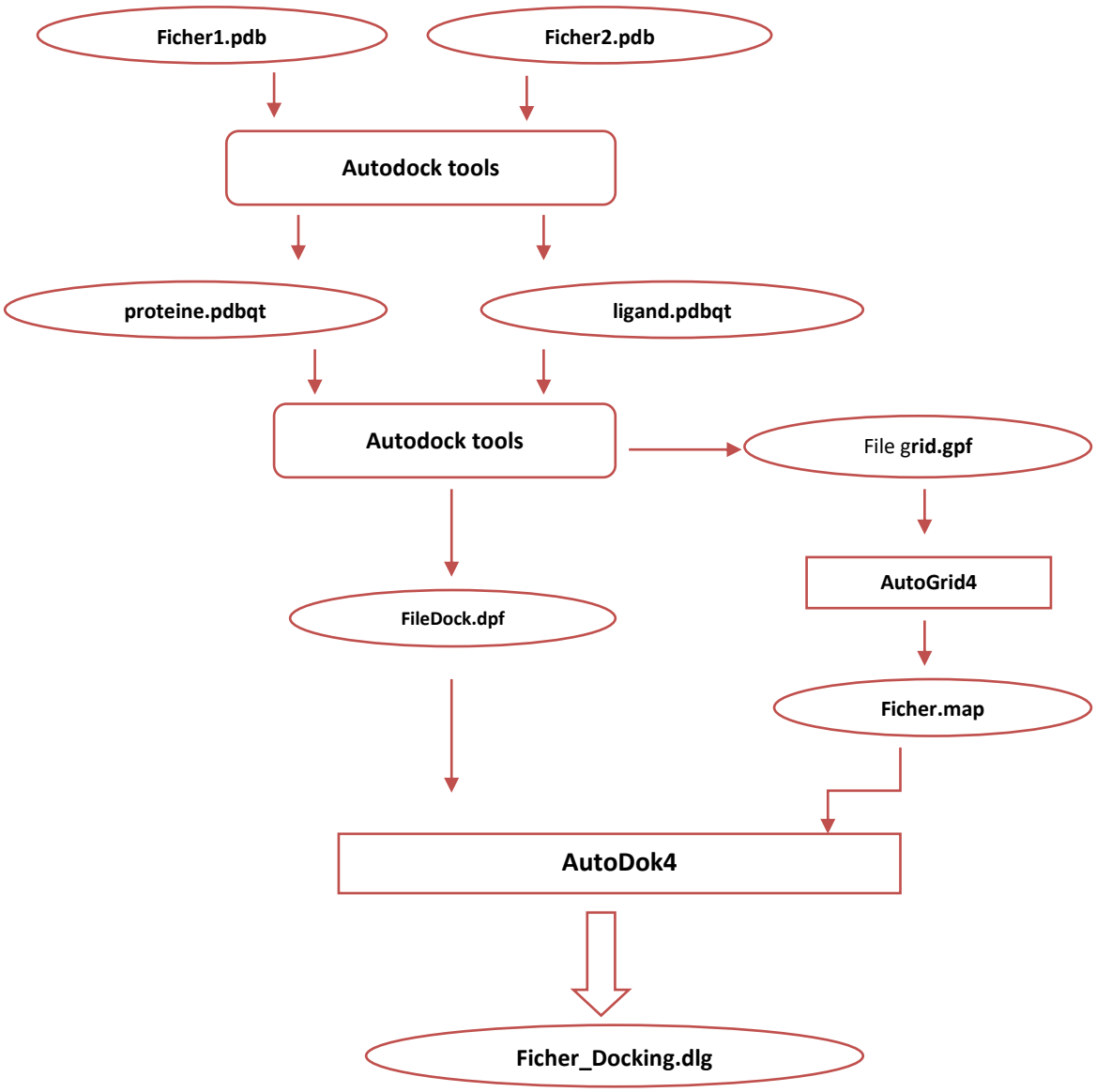


FIG.2.15 Les étapes de docking moléculaire par AutoDock

2.6.9 AFFICHER LES INTERACTIONS

1. Pour afficher les interactions 3D de protéine avec ligand en cliquant sur : **Analyse** → **Docking** → **show interaction.**

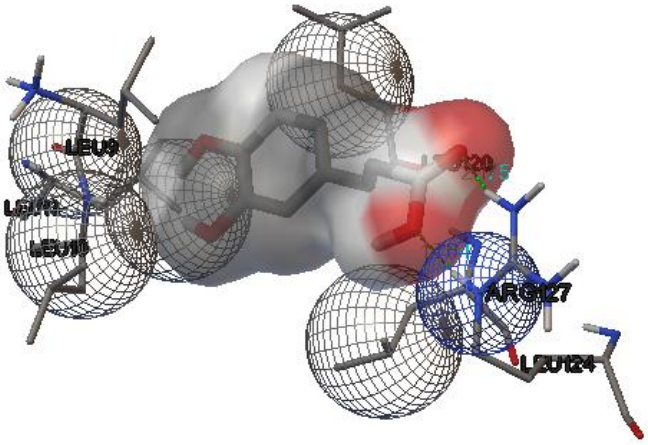


FIG.2.16. Exemple de l'interaction 3D de protéine-ligand réalisé par AutoDock

2. Pour montre les interactions 2D, Nous préparons d'abord un ficher de complexe (protéine-ligand) par cliquant sur **Write Complex** que l'on trouve dans une fenêtre de les options de lecture et enregistré sous forme **pdbqt.**

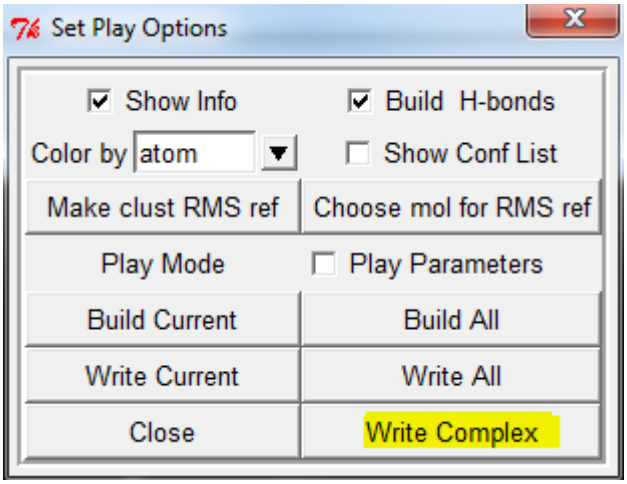


FIG.2.17. Interface des options de lecture

Ce fichier doit être converti de format pdbqt en format **pdb** par **Avogadro** et enregistré pour utiliser sur **ProteinsPlus.**

Ensuite, nous avons téléchargé le ficher de complexe qui déjà enregistré sous forme **pdb** dans le site de **ProteinsPlus** et cliquent sur **GO.**

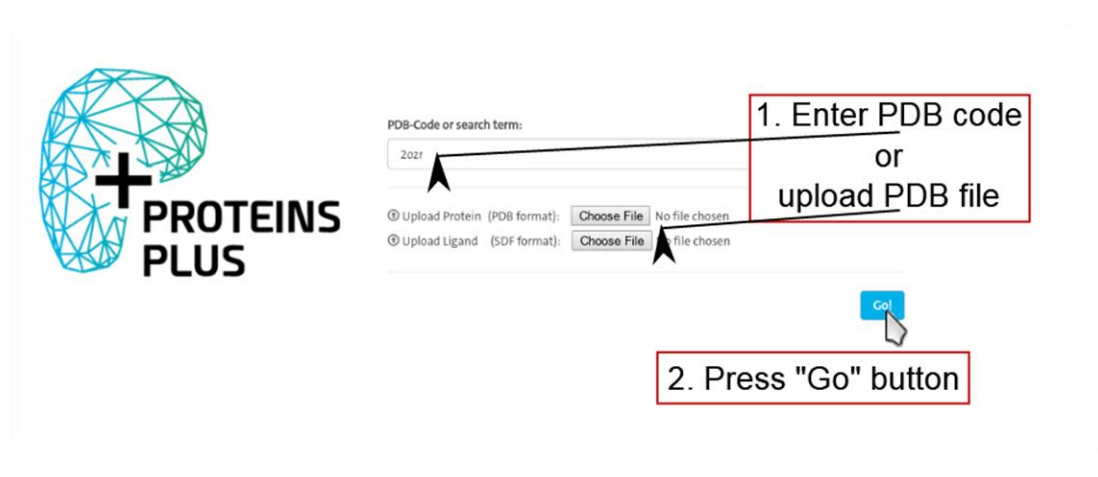


FIG. 2.18. Préparation le ficher de complexe dans ProteinsPlus

Parmi les fonctions de ProteinsPlus nous avons choisi **PoseView 2D interaction diagrams** pour visualisez les structures et créez des représentations de pose 2D (PoseView).

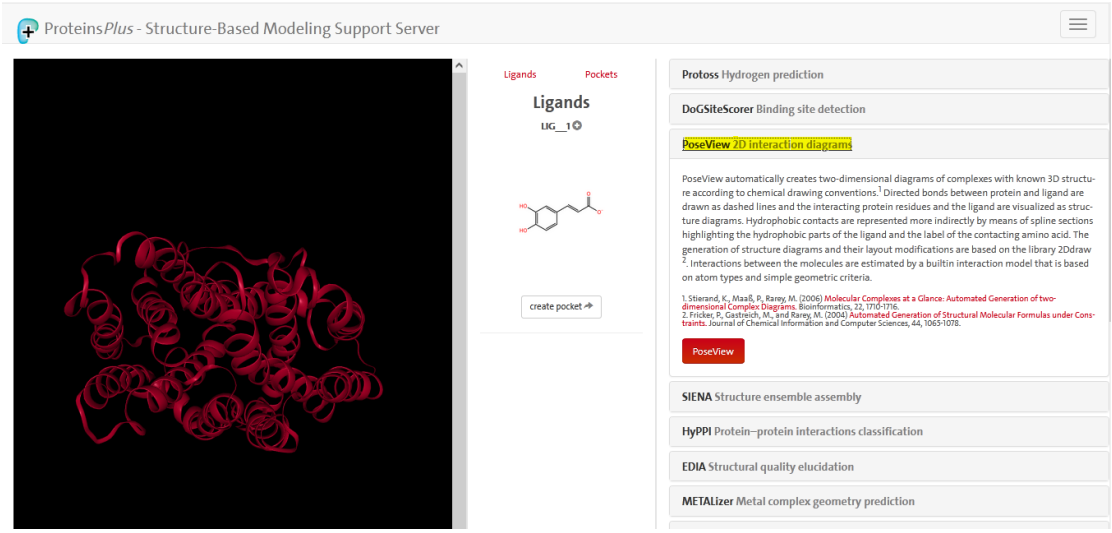


FIG.2.19. Interface les fonctions de ProteinsPlus

Puis choisi le ligand et sélectionné sur **Calculât .**

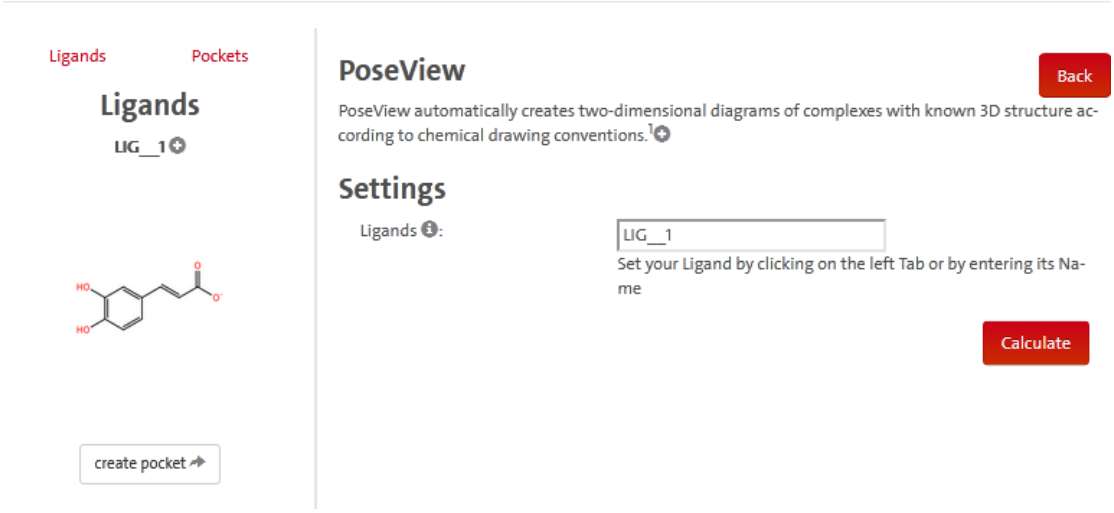


FIG.2.20. Préparation de ligand

Finalement nous avons obtenir les interactions 2D de protéine – ligand

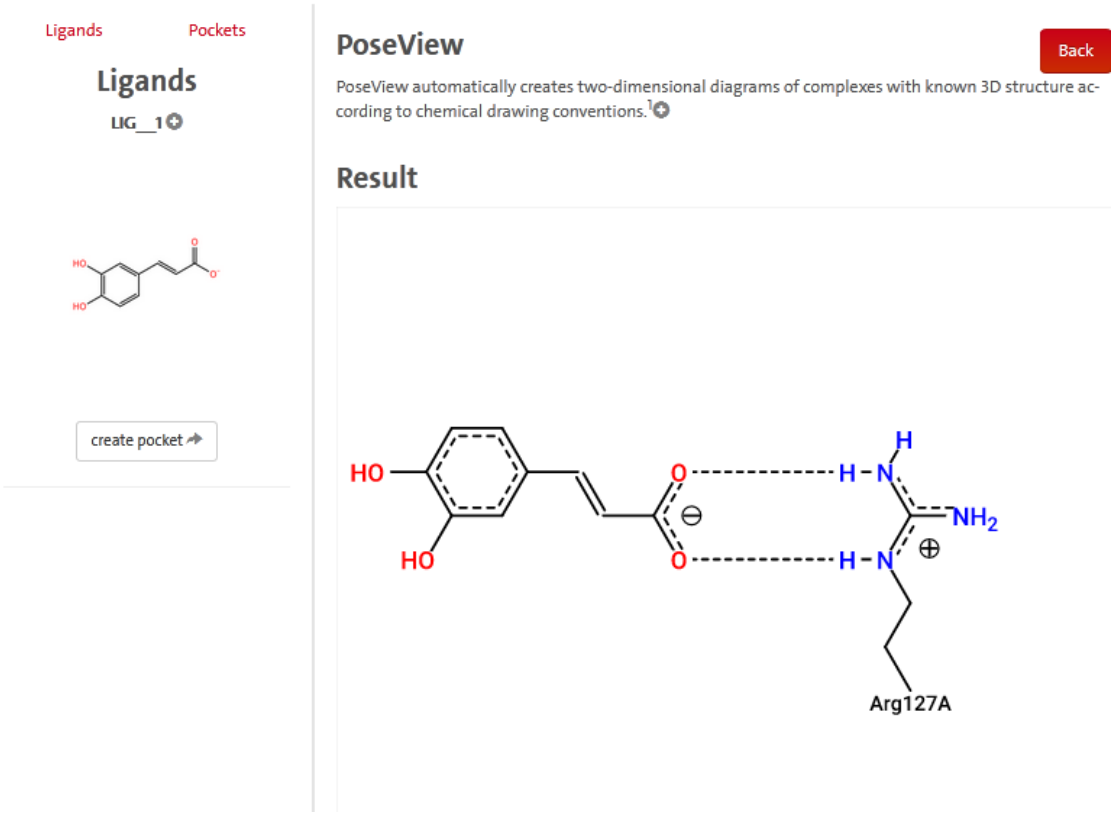


FIG. 2.21. Exemple de l'interaction 2D réalisé par ProteinsPlus

CHAPITRE 3.RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION

3.1 L'INHIBITION IN VITRO /IN SILICO DE MECANISME DE L'EFFLUX CHEZ E.COLI PAR LES DERIVIES DE TETRAHYDROPYRIDINE

3.1.1IN VITRO

Grâce à des études littéraires, ils ont obtenu que les dérives **Tétrahydropyridine** présente meilleurs activité d'inhibition de mécanisme l'efflux de l'*E.coli* similaire a CPZ, c'est dérive ne sont pas toxique pour les cellules eucaryote.

3.1.2 IN SILICO

Lorsqu'on a utilisé une structure PDB, on a remarqué que certaines structures des protéines contiennent plusieurs chaines comme ce cas d'*E.coli*.

Donc nous avons étudie l'interaction entre les trois chaines **(4DX5-A, 4DX5-B et 4DX5-C)**de la structure **E.coli (PDB ID 4DX5)** et **Tétrahydropyridine** qui présent meilleur candidat pour inhibée le mécanisme de l'efflux chez *E.coli* par utilisation de **AutoDockTools**.

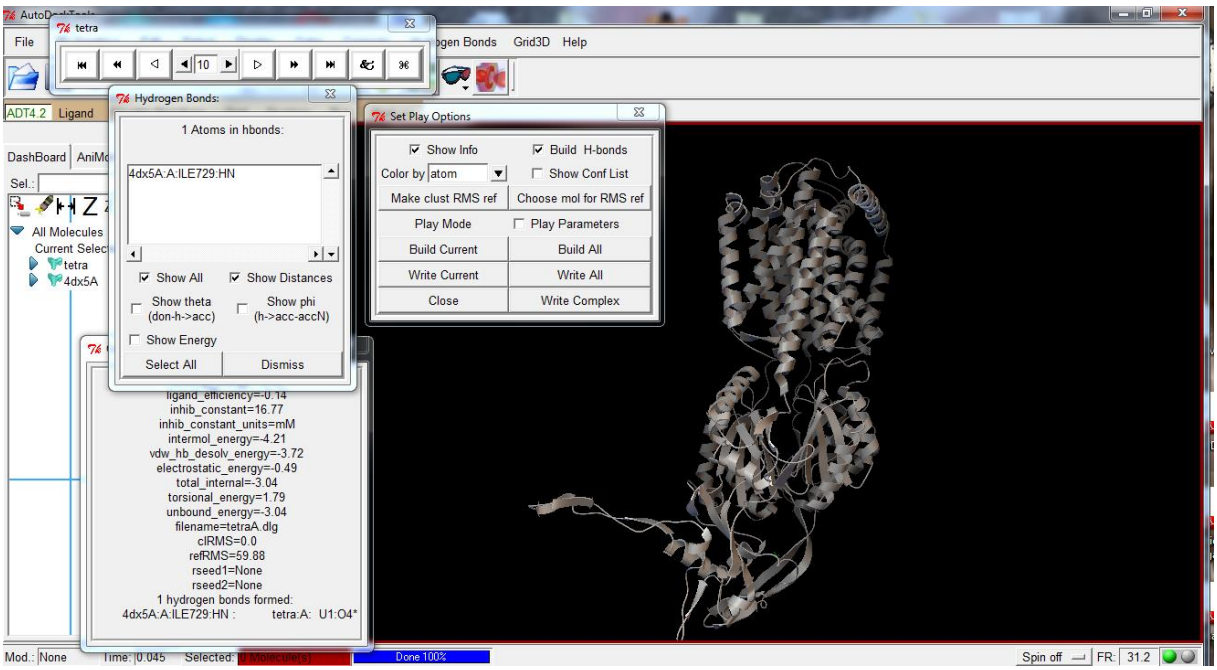


FIG.3.1. Résultat de docking de Tétrahydropyridine avec chaine A.

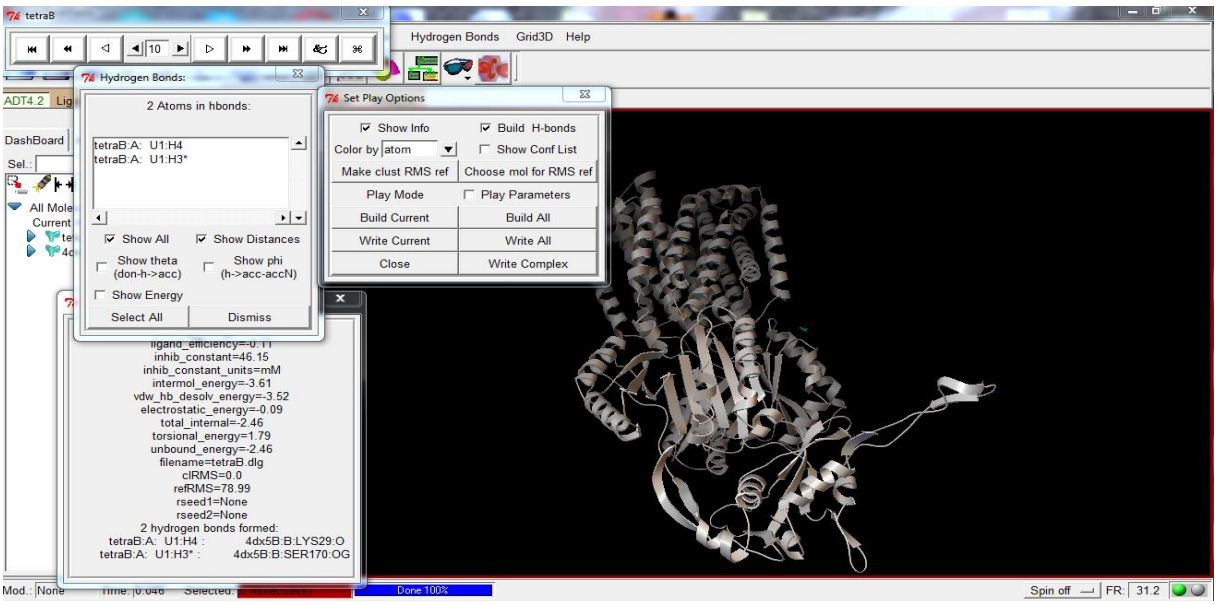


FIG.3.2. Résultat de docking de Tétrahydropyridine avec chaine B.

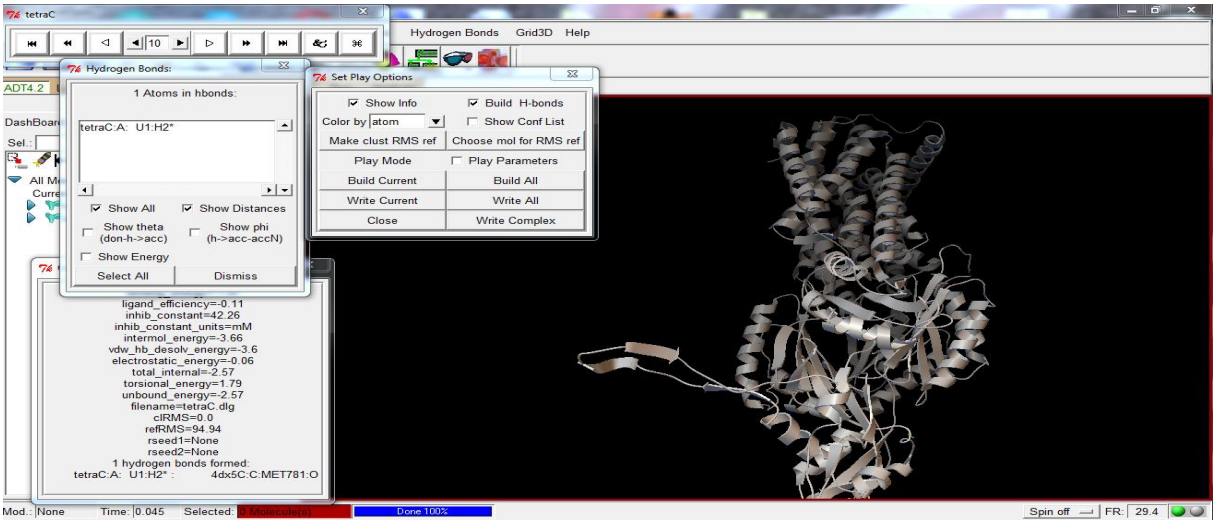


FIG.3.3.Résultat de docking de Tétrahydropyridine avec chaine C.

3.1.2.1 CONFORMATION

Le résultat de docking est présenté dans les 3 figures ci-dessous, qui montre 10 conformations de l'énergie de liaison minimale de chaque chaîne avec Tétrahydropyridine.

Donc l'extension 1_1 c'est le meilleur résultat de chaque chaine avec Tétrahydropyridine qui représente l'énergie de liaison plus fiable.

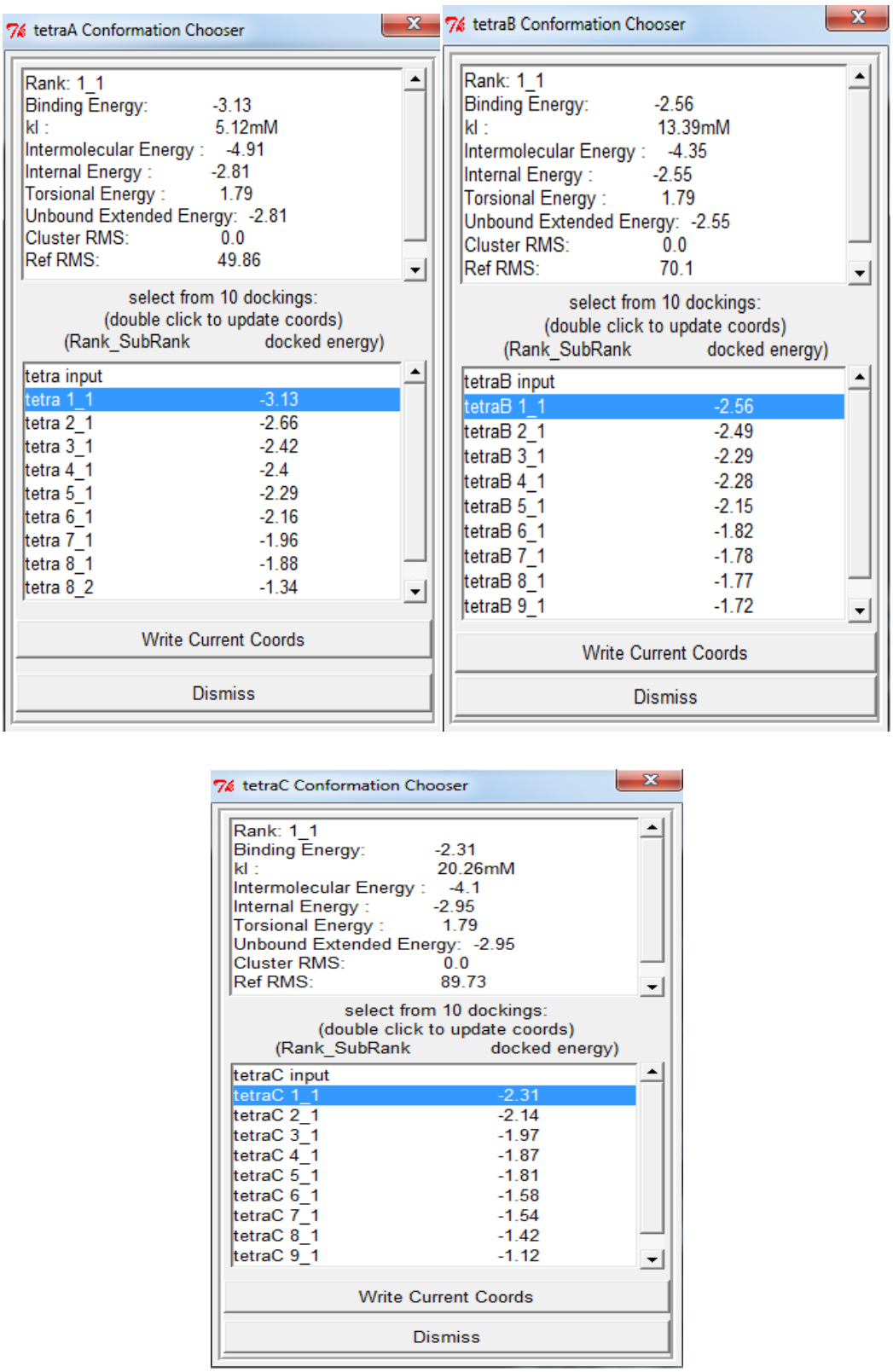


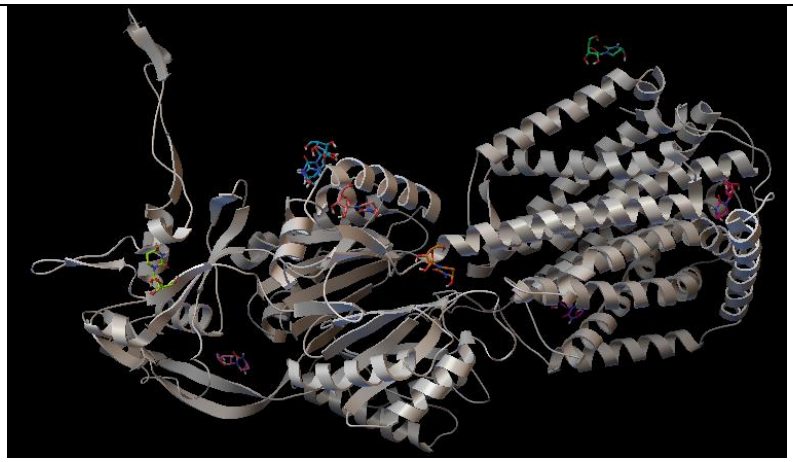
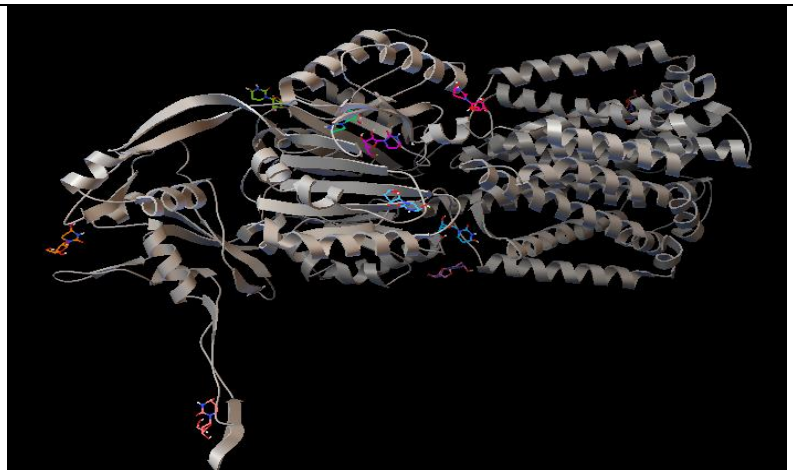
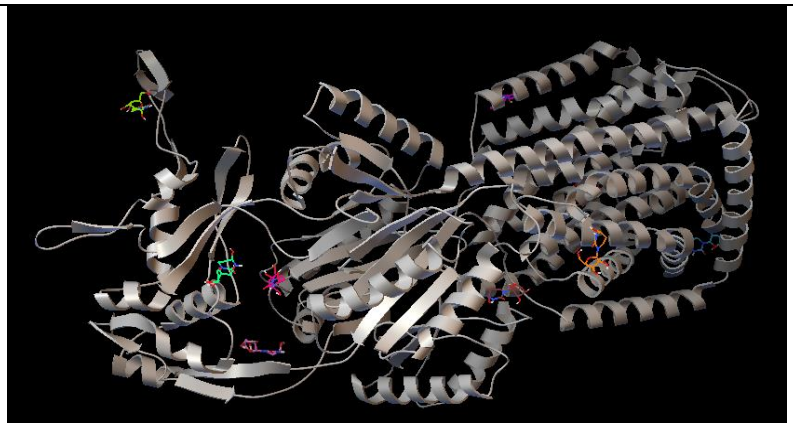
FIG.3.4. Meilleur conformation de Tétrahydropyridine pour la chaine A, B et C.

3.1.2.2 INTERACTION ENTRE 4DX5 ET TETRAHYDROPYRIDINE

A. POSITIONS POSSIBLE POUR FIXATION TETRAHYDROPYRIDINE DANS LES CHAINES 4DX5 (4DX5-A, 4DX5-B ET 4DX5-C)

On a observe 10 positions candidats de Tetrahydropyridine qui interagie avec les sites de protéines 4DX5 sur chaque chaines (A, B et C).

TABLEAU 3.1 Représente les positions possibles pour interaction de Tetrahydropyridine avec 4DX5.

4DX5	Positions possible pour fixation Tétrahydropyridine
4DX5-A	
4DX5-B	
4DX5-C	

3.1.2.3 MEILLEUR POSITION ENTRE 4DX5 ET TETRAHYDROPYRIDINE

Comme on a dit précédemment l'extension 1_1 c'est le meilleur résultat qui représente l'énergie de liaison plus fiable, donc les figures dessous représentent meilleur position de l'interaction de chaque chaine avec Tétrahydropyridine

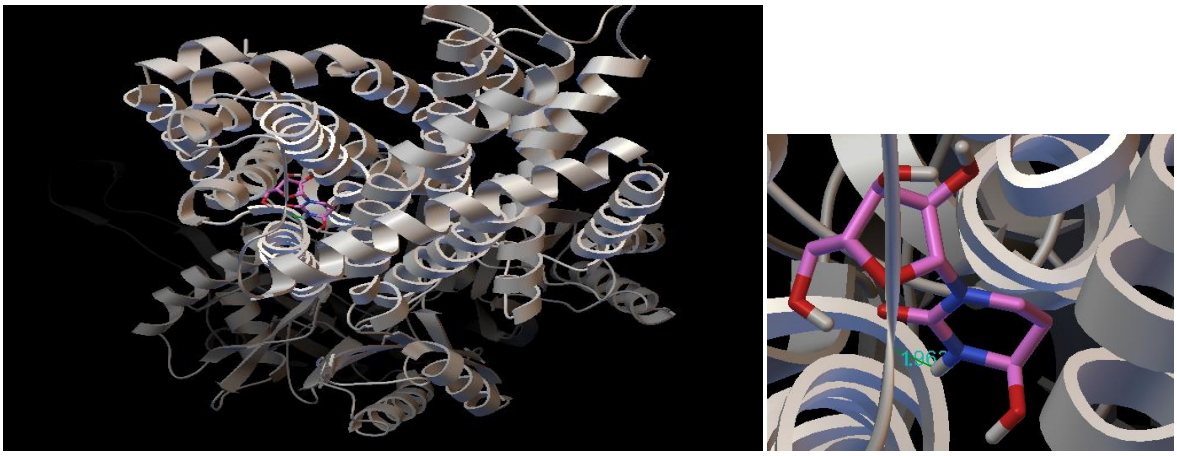


FIG .3.5. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 4DX5-A et TETRAHYDROPYRIDINE.

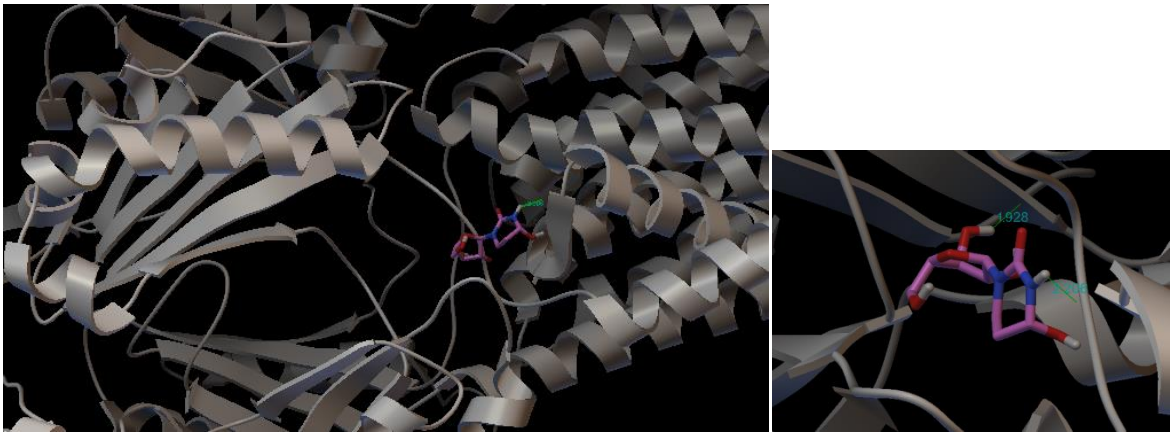


FIG.3.6. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 4DX5-B et TETRAHYDROPYRIDINE.

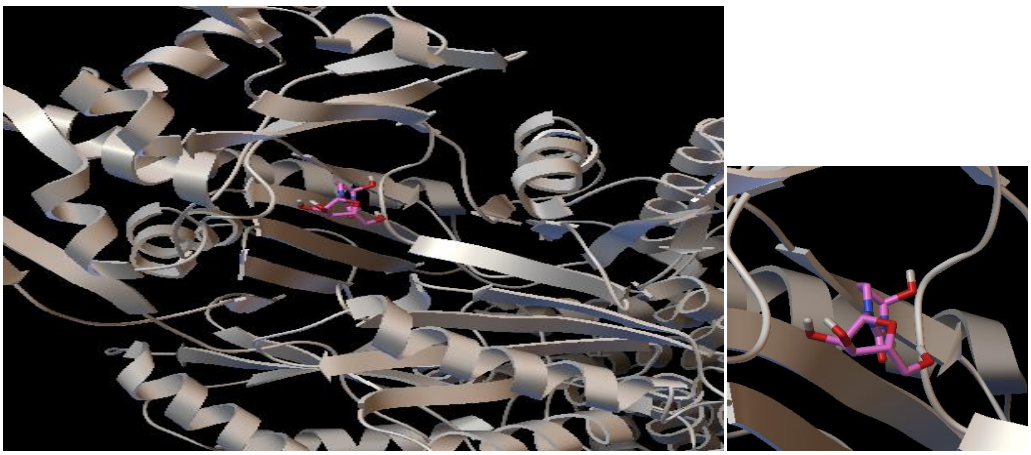


FIG.3.7. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 4DX5-C et TETRAHYDROPYRIDINE.

Les résultats de conformation de chaque chaines avec ligand candidat en fonction de l'énergie se présent dessous par des figures, nous remarquons que la technique de docking a sélectionnée les conformations candidates pour Tétrahydropyridine qui sont interagissent mieux avec les sites de 4DX5-A, 4DX5-B et 4DX5-C.

Comme on a dit précédemment que les conformations avec l'énergie minimale présentent le meilleur résultat pour le docking, donc l'énergie minimale la plus faible pour Tétrahydropyridine avec 4DX5-A c'est : -3.13 Kcal/mol, avec 4DX5-B : -2.56 Kcal/mol et avec 4DX5-C : -2.31 Kcal/mol.

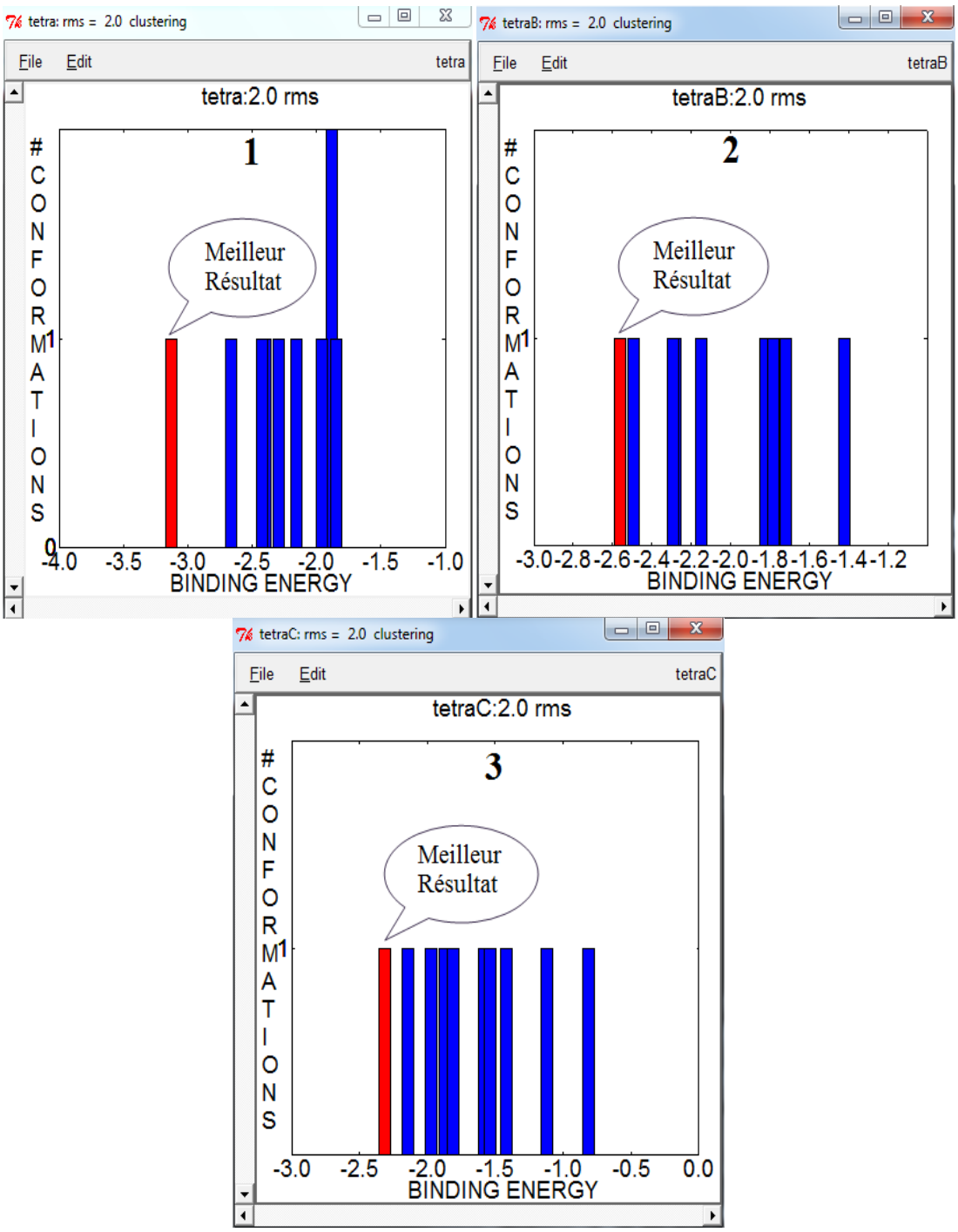


FIG. 3.8. Histogramme de résultat de conformation pour Tétrahydropyridine avec (1) 4DX5-A, (2) 4DX5-B et(3) 4DX5-C.

Le résultat de docking est enregistré dans un fichier avec l'extension pdbqt, qui présente meilleur résultat de ligand candidat qui évalue par l'énergie minimale.

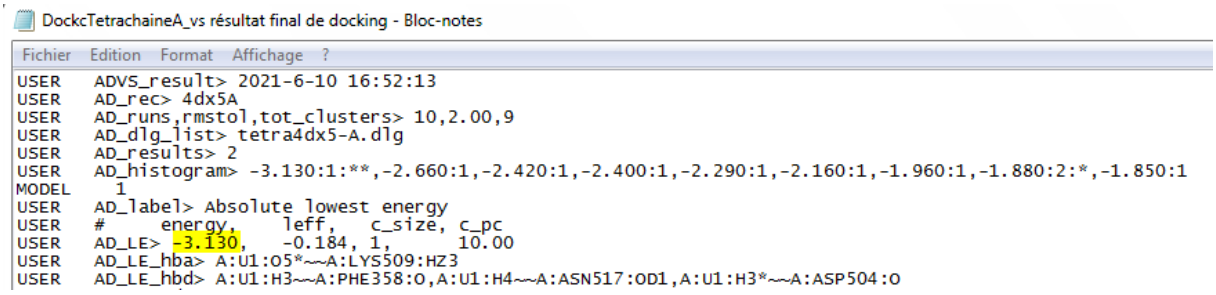


FIG.3.9. Résultat final de docking pour 4DX5-A.

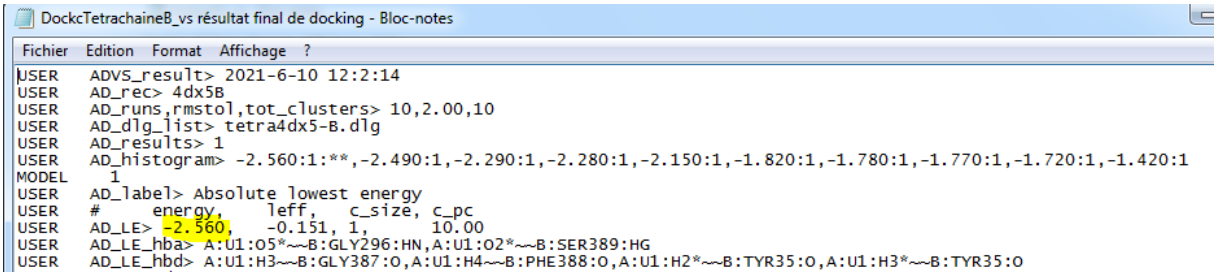


FIG.3.10. Résultat final de docking pour 4DX5-B.

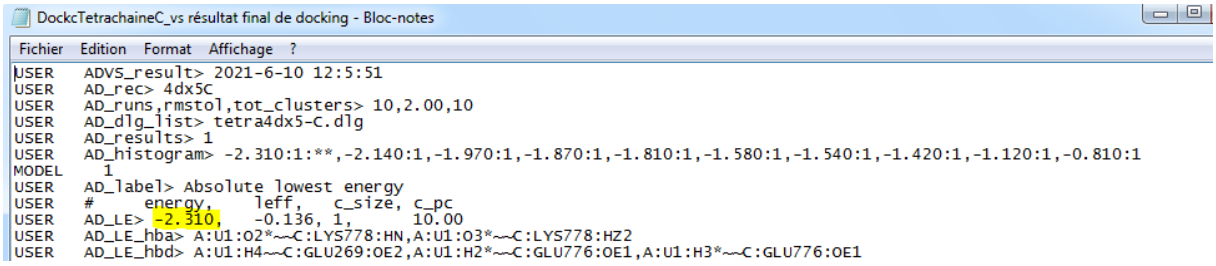


FIG.3.11. Résultat final de docking pour 4DX5-C.

Après la comparaison entre l'énergie de fixation de chaque chaine de protéine *E. coli* (4DX5) avec Tétrahydropyridine on a observe que les ancrages à la structure 4DX5-A indiquent que Tétrahydropyridine a énergie de liaison libre plus faible par rapport les autres chaines, donc le meilleur résultat de l'inhibition de structure *E.coli* par Tétrahydropyridine in silico, c'est la chaine A.

3.2 INHIBITION IN VITRO/IN SILICO EFFLUX PUMP DES STAPHYLOCCOCUS AEUREUS PAR ACIDE CAFEIQUE ET L'ACIDE GALLIQUE

3.2.1 IN VITRO

L'acide gallique nécessite une plus grand quantité d'antibiotique pour obtenir l'effet tandis que **l'acide caféique** caractérise par un action synergique, les deux acide provoque une inversion du phénotype de résistance, mais le meilleur **inhibiteur** entre eux c'est **l'acide caféique** qui constitue un inhibiteur efficace de la pompes NorA efflux de *S.aureus*.

3.2.2 IN SILICO

Cette fois nous avons étudies l'interaction entre les 2 acides caféique et gallique et la protéine **efflux pumps** de *Staphyloccocus aureus*(2GFP) et l'estimation de l'énergie de fixation de ces deux acide réalise par l'**AUTODOCK** et on comparée entre les résultats.

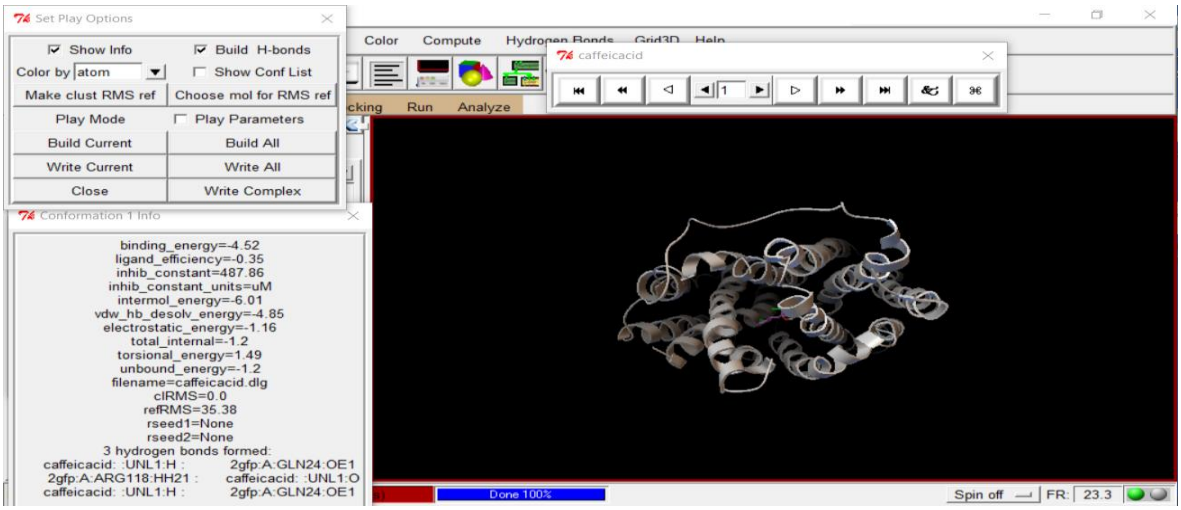


FIG.3.12. Résultats de docking de l'Acide caféique.

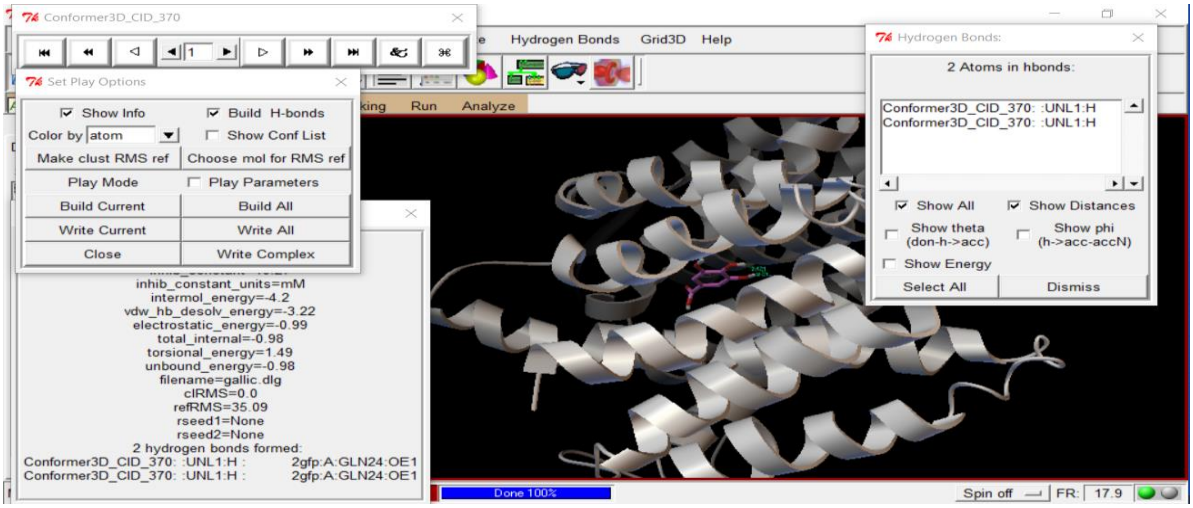


FIG.3.13.Résultat de docking Acide gallique.

3.2.2.1 CONFORMATION

Les 2 figures ci-dessous présentes les 10 conformations avec l'énergie de liaison pour l'acide caféique et l'acide gallique.

L'énergie de fixation pour l'Acide caféique :-4 ,52 Kcal/mol.

L'énergie de fixation pour l'Acide gallique :-3 ,22 Kcal/mol.

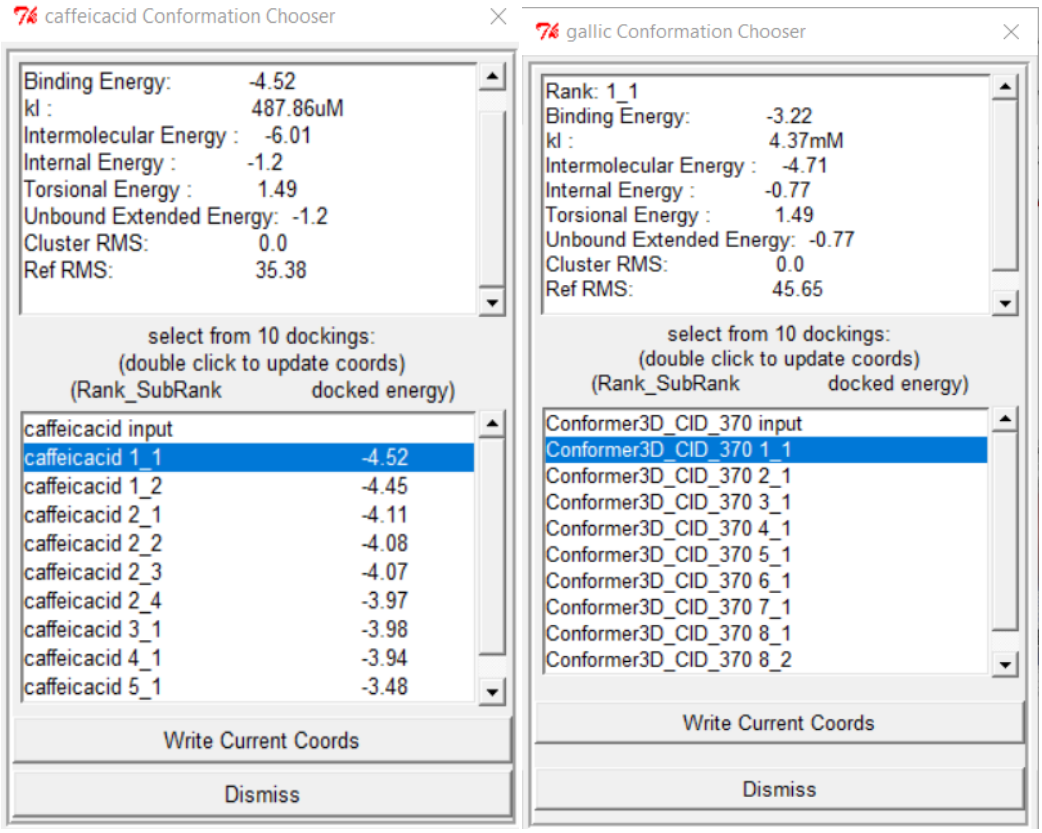


FIG.3.14. Conformation de L'Acide caféique/ l'acide gallique.

Les figure suivant représente la meilleure position de l'Acide caféique /gallique avec le protéine :

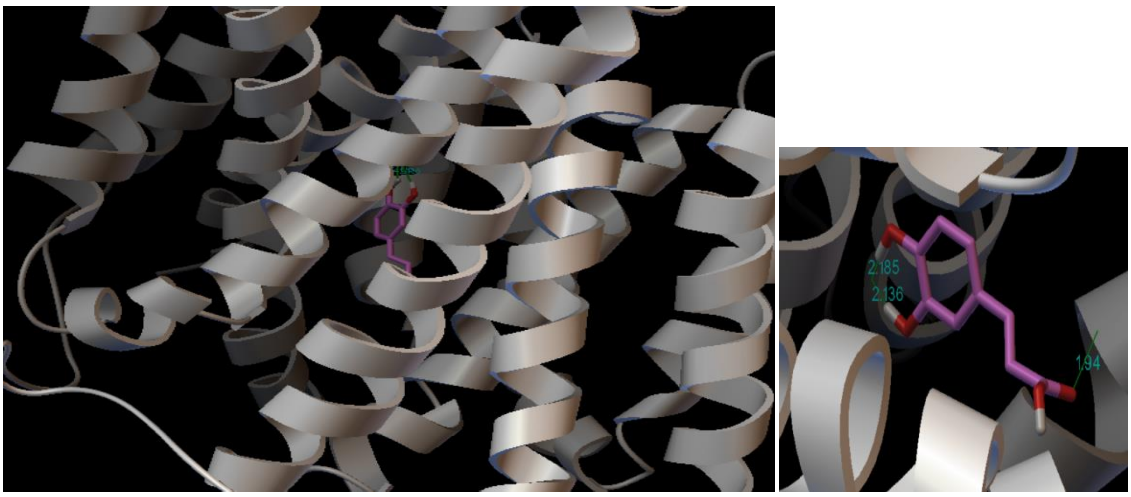


FIG.3.15. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre NorA efflux pumps et l'Acide caféique.

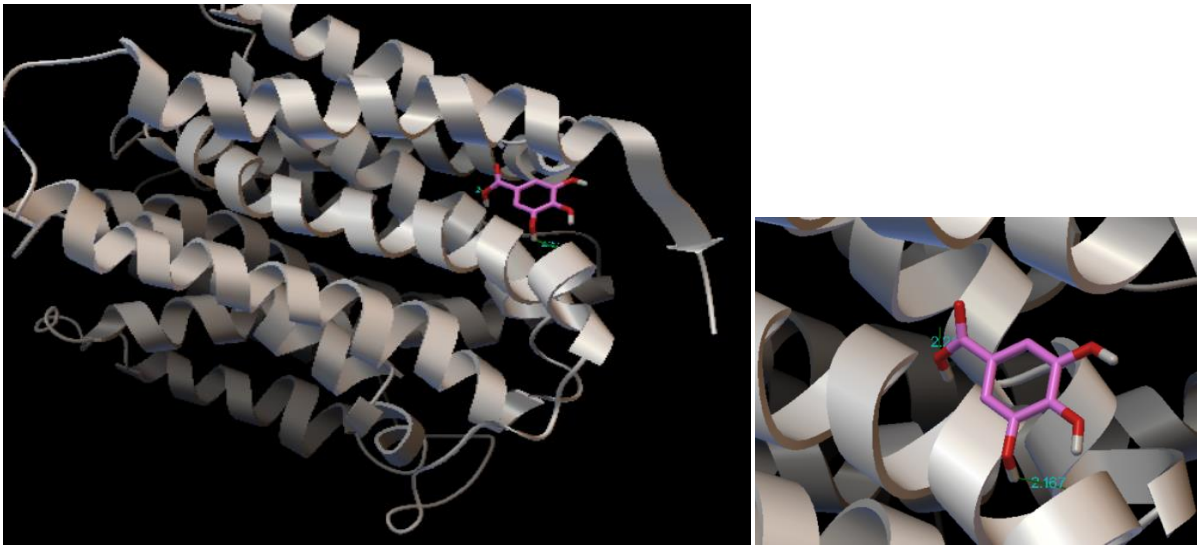


FIG.3.16. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre NorA efflux pumps et l'acide gallique.

3.2.2.2 INTERACTION

Les inhibiteurs **Acide caféique** et **Acide gallique** former des liaisons hydrogènes avec les acides aminés de la chaîne latérale de chaque protéine dans la position 1_1.

3.2.2.3 INTERATION D'ACIDE CAFEIQUE ET 2GFP

L' inhibiteur **Acide caféique** former des liaisons hydrogènes avec les acides aminés de la chaîne latérale de protéines 2gpf :**ARG127A.**

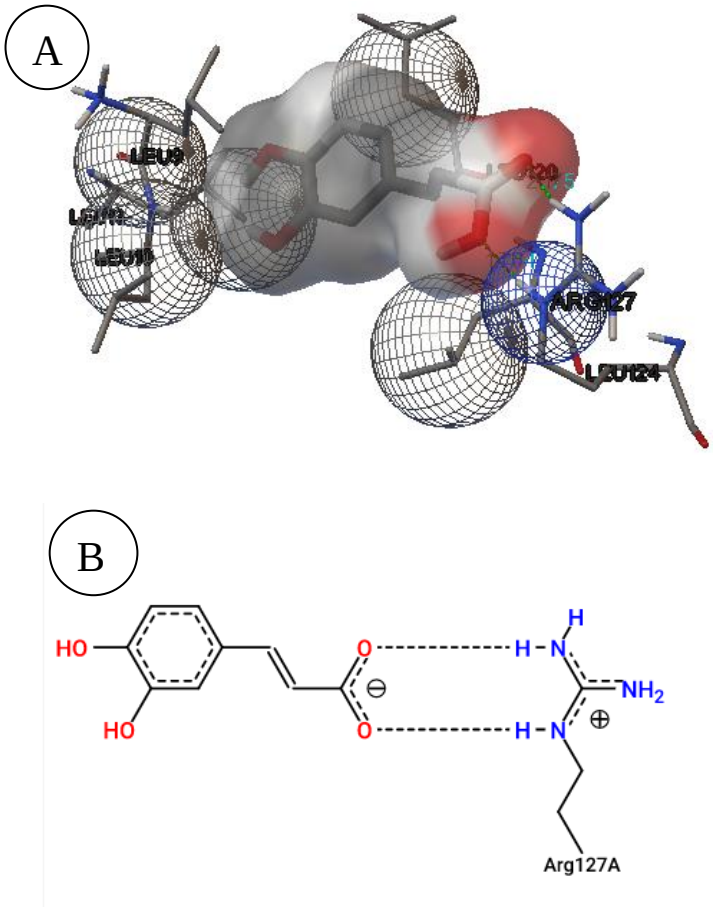
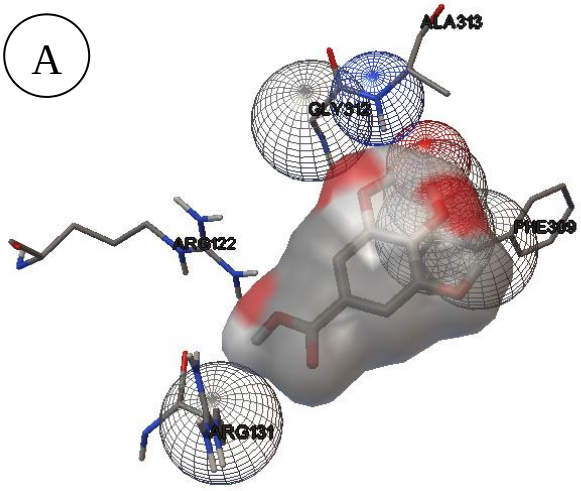


FIG.3.17. Interaction entre acide caféique et 2GFP, (A) structure 3D et (B) 2D.

3.2.2.4 INTERACTION D'ACIDE GALLIQUE ET 2GFP

Acide gallique est fixe par des liaisons hydrogène avec acide amine suivant : **ALA313A**, **LEU124**, **PHE309A.**



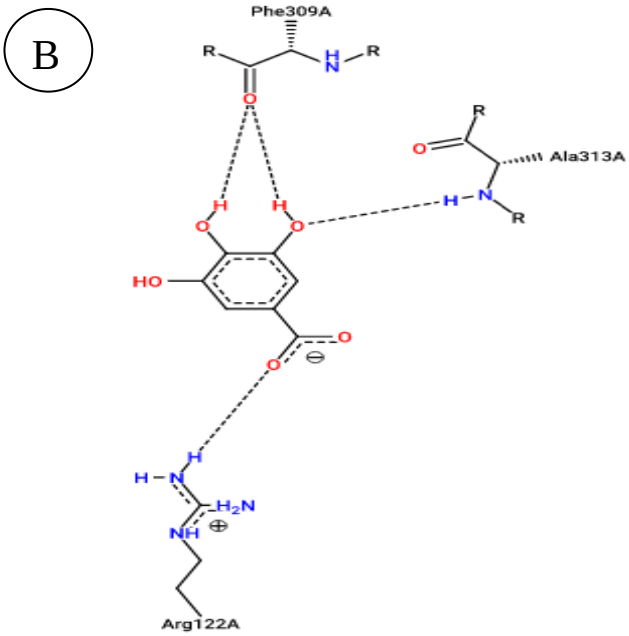


FIG.3.18. Interaction entre acide gallique et 2GFP, (A) structure 3D et (B) 2D.

Les captures ci-dessous présentes les résultats de conformations des ligands candidats en fonction de l'énergie. On peut constater que le ligand avec l'énergie minimale présente un bon résultat de conformation.

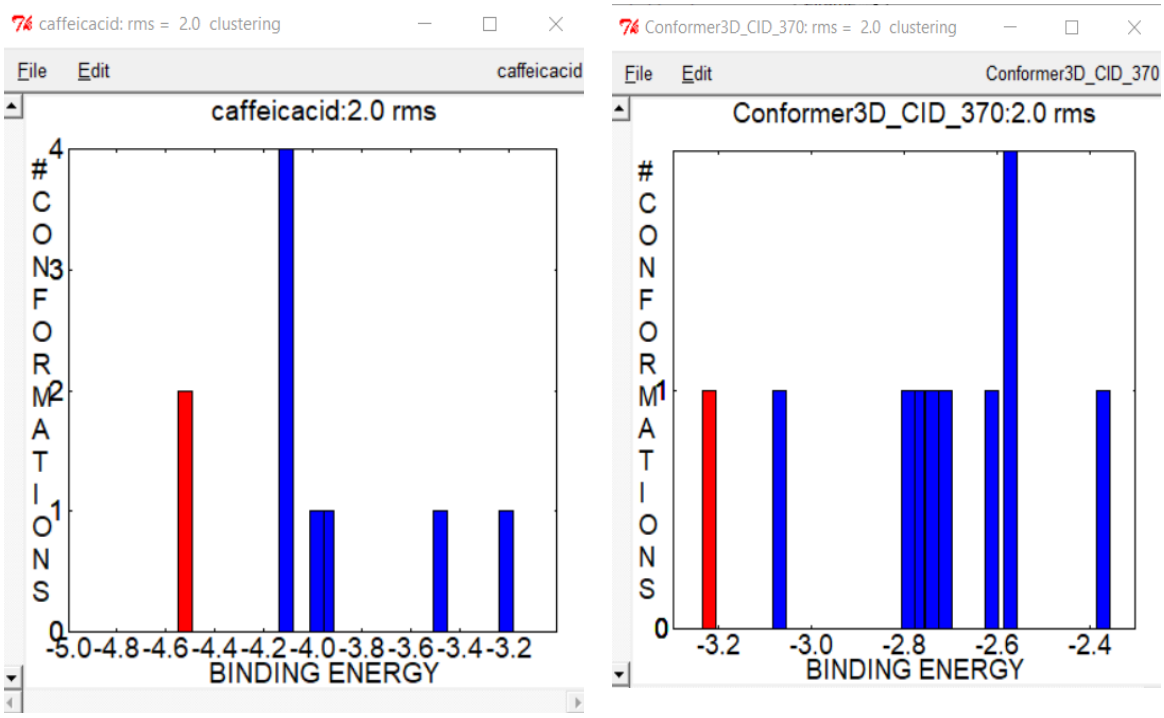


FIG.3.19. Histogramme de résultat de conformation

On peut vérifies les résultats a partir d'un ficher qui enregistres automatique par l'**AutoDock** ce fichier avec l'extension pdbqt « résultat de docking » .

Dans ce fichier on remarque le meilleur ligand candidat, celui avec une énergie minimale par rapport aux autres ligands.

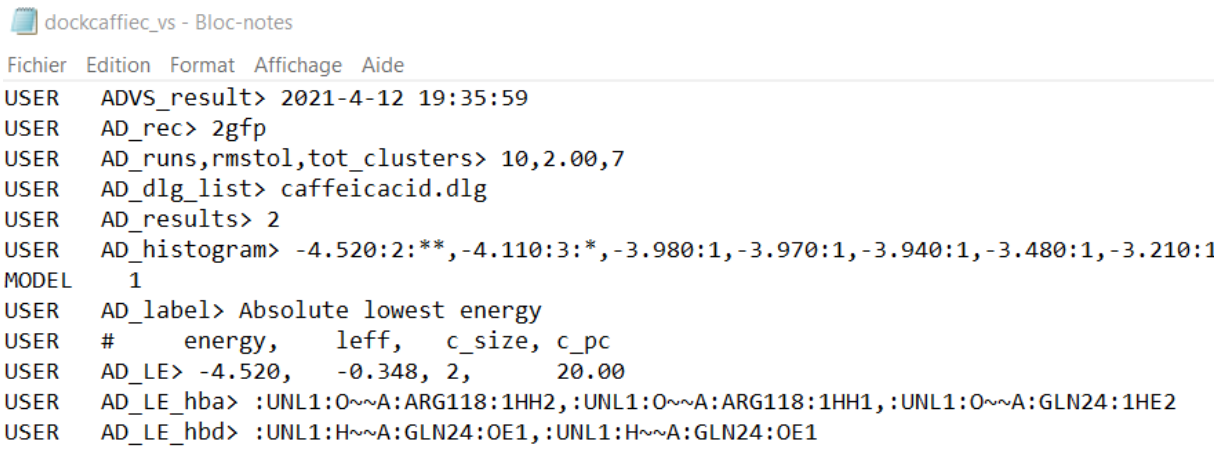


FIG.3.20. Dockcaffiec_vs résultat final de docking.

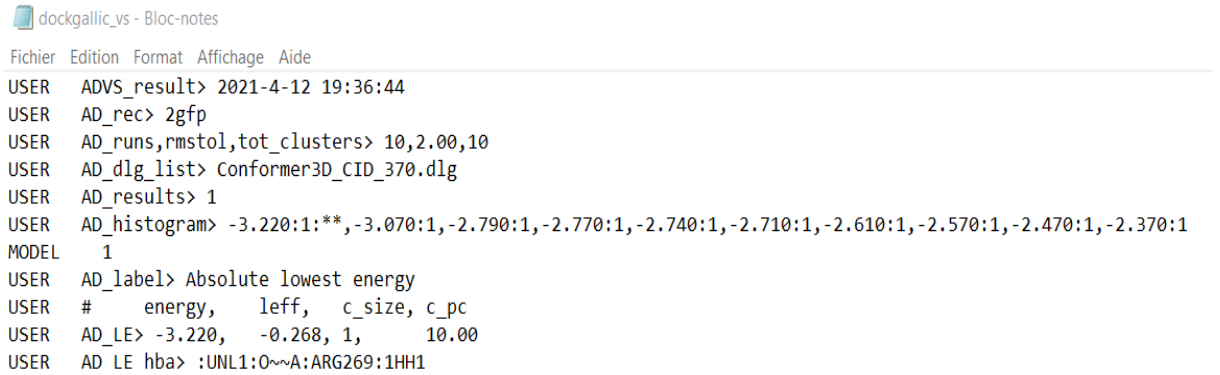


FIG.3.21. Dockgallic_vs résultat final de docking.

Après la comparaison entre l'énergie de fixation de deux acide avec la même protéine, l'étude est montre que l'acide caféique constituent un meilleur inhibiteur de Nora efflux pump de ***S.aureus.***

TABLEAU 3.2 Représente l'énergie de fixation d'acide caféique et acide gallique avec 2gfp.

Inhibiteurs	Formes moléculaire	Energie de liaison	Les acides amines
Acide caféique	$C_9H_8O_4$	-4.520Kcal/mol	ARG127A
Acide gallique	$C_7H_6O_5$	-3.22kcal/mol	ALA313A, LEU124, PHE309A

3.3 INHIBITTION LA FORMATION DES BIOFILM DE PSEUDOMONAS AERGINOSAIN SILICO PAR 3, 5, 7-TRIHYDROXYFLAVONE DE ALSTONIA SCHOLARIS

3.3.1 IN VITRO

D'après littérature les différentes concentrations (25, 50 et 100 µg / mL) de **TF** peuvent inhiber la formation de biofilm de P.aeruginosa avec une **efficacité 85%.** De plus **TF** peut inhiber la croissance des bactéries planctoniques et également ont la capacité de réduire les exo polysaccharides.

3.3.2 IN SILICO

Le **3, 5,7-Trihydroxyflavone** TF a été amarrés avec différentes protéines de QS telles que (Las I et Rhl I, Las R, AHLase).

On utilise AutoDockTools pour calcule l'énergie d'interaction le ligand et tous les protéines de QS. L'énergie d'interaction de protéine ligand montre, si le QS est inhibé par ce ligand TF.

Le TF est lié efficacement aux sites particuliers dans la protéine QS (LasI, LasR, rhlR, et AHLase) de P.aeruginosa (tableau).

Le docking moléculaire de LasI, LasR, rhlI et AHLase révèle que la 3,5,7 Trihydroxyflavone se lie de manière compacte au récepteur et forme un complexe.

3.3.2.1 CONFORMATION

Chaque protéine présente 10 conformation dont « la conformation 1_1 » représente toujours la meilleur résultat.

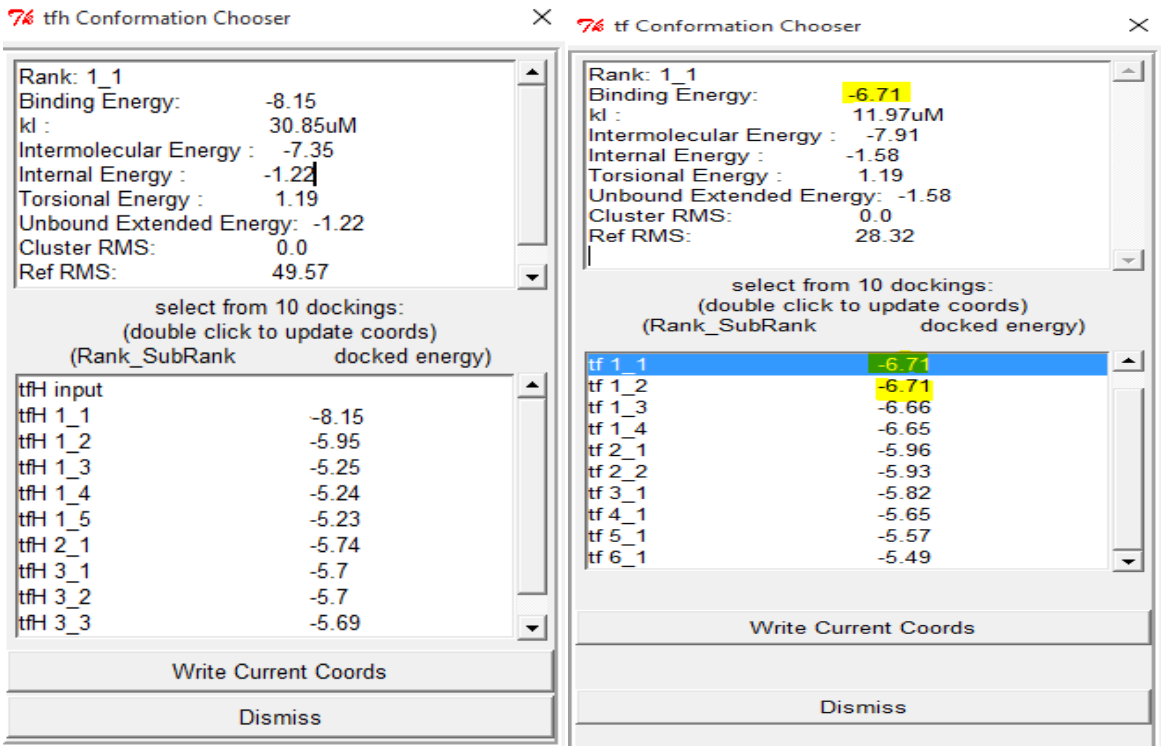


FIG.3.22. Conformation de TF avec 2UV0 et 2BR6.

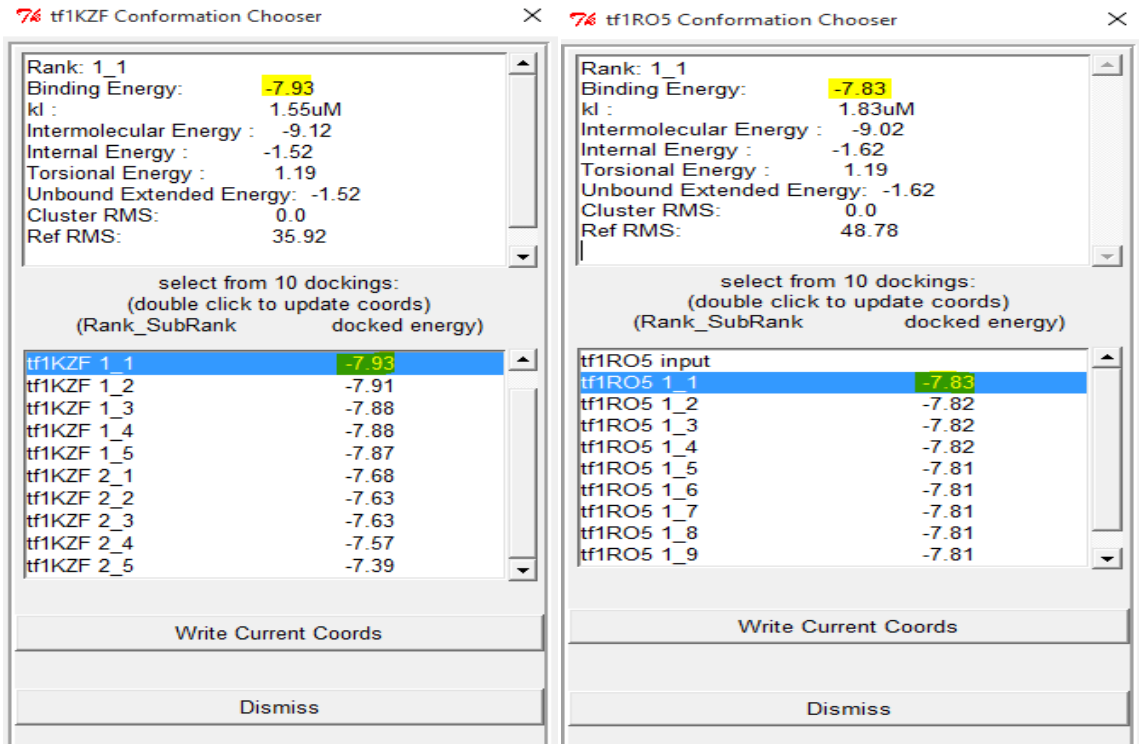


FIG. 3.23. Conformation de TF avec 1KZF et 1RO5.

Un clique sur l'extention 1_1 donne la meilleur position de la ligand dans la protéine.

Les figure suivant représente meilleur position de la ligand dans chaque protéine .

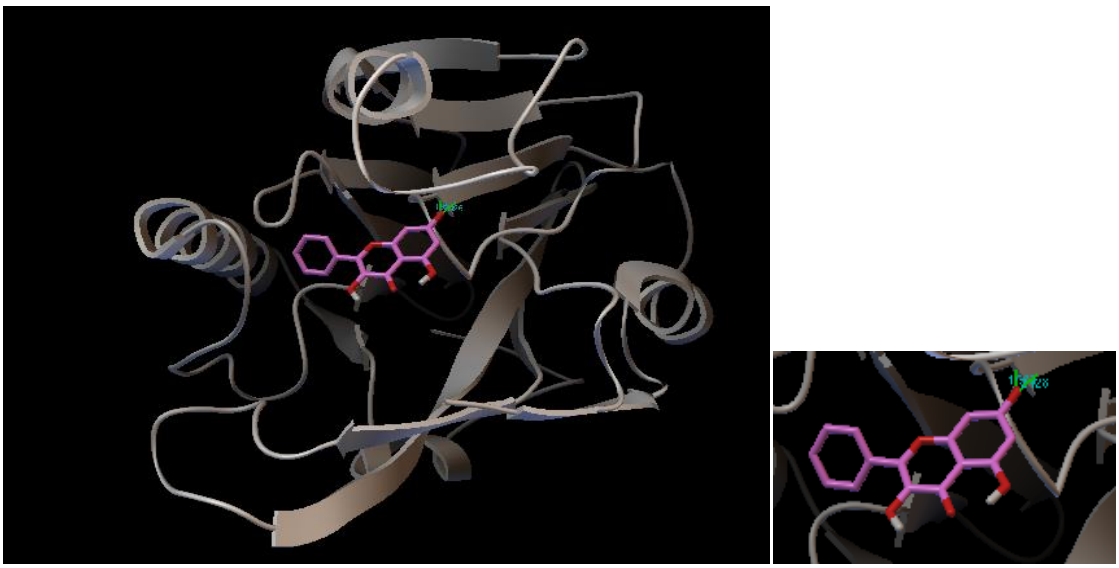


FIG.3.24. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 2BR6 et TF.

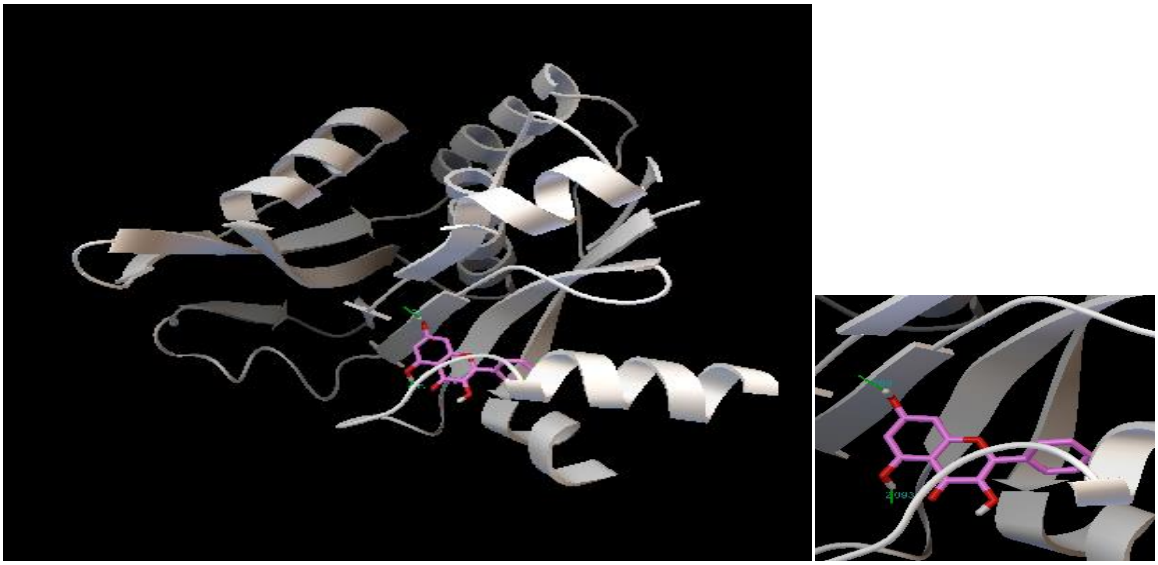


FIG.3.25. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 1kzf et TF.

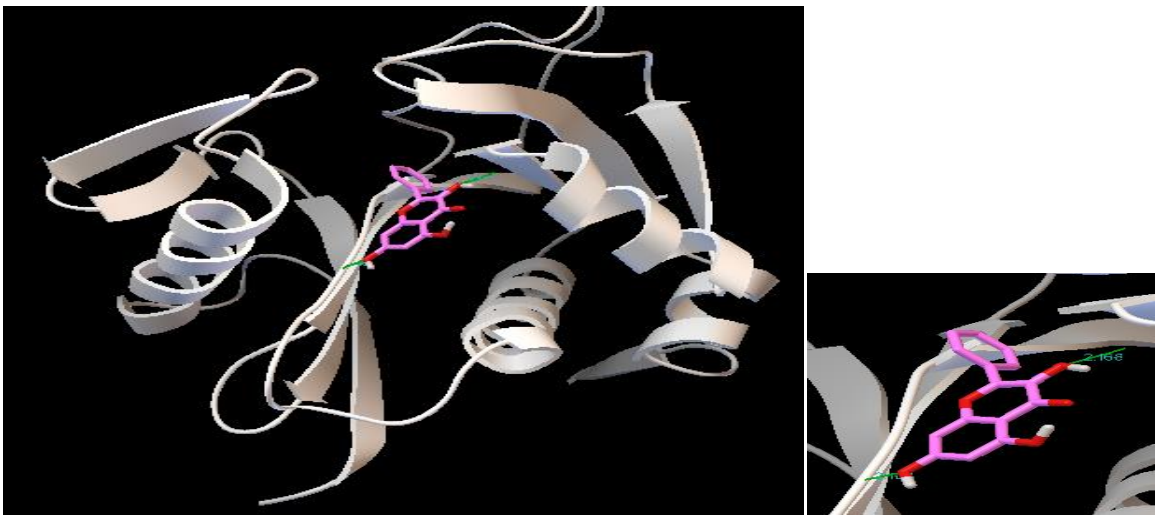


FIG.3.26. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 1RO5 et TF.

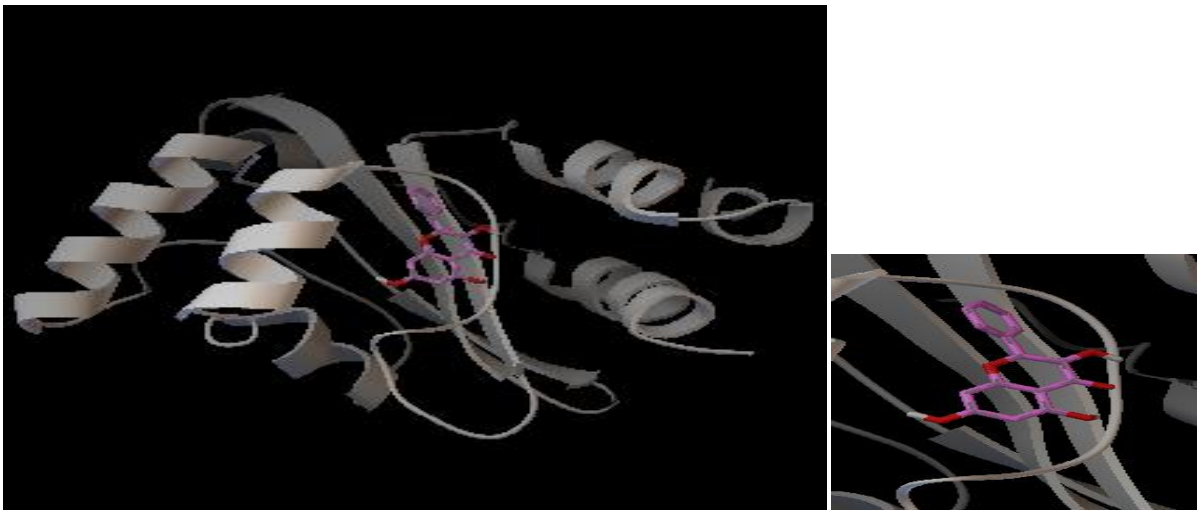


FIG.3.27. Meilleur position « 1_1 » de l'interaction entre 2UV0 et TF.

3.3.2.2 INTERACTION

L'inhibiteur **Tf** formé des liaisons hydrogènes avec les acides aminés de la chaîne latérale de chaque protéine dans la position 1_1.

3.3.2.3 INTERACTION 2BR6 ET TF

L'énergie minimal de fixation est :-6.2 Kcal/mol, la ligand est fixe par des liaison hydrogène avec les acide amine suivant ARG13A .GLY12A. PRO34A. PRO10A.

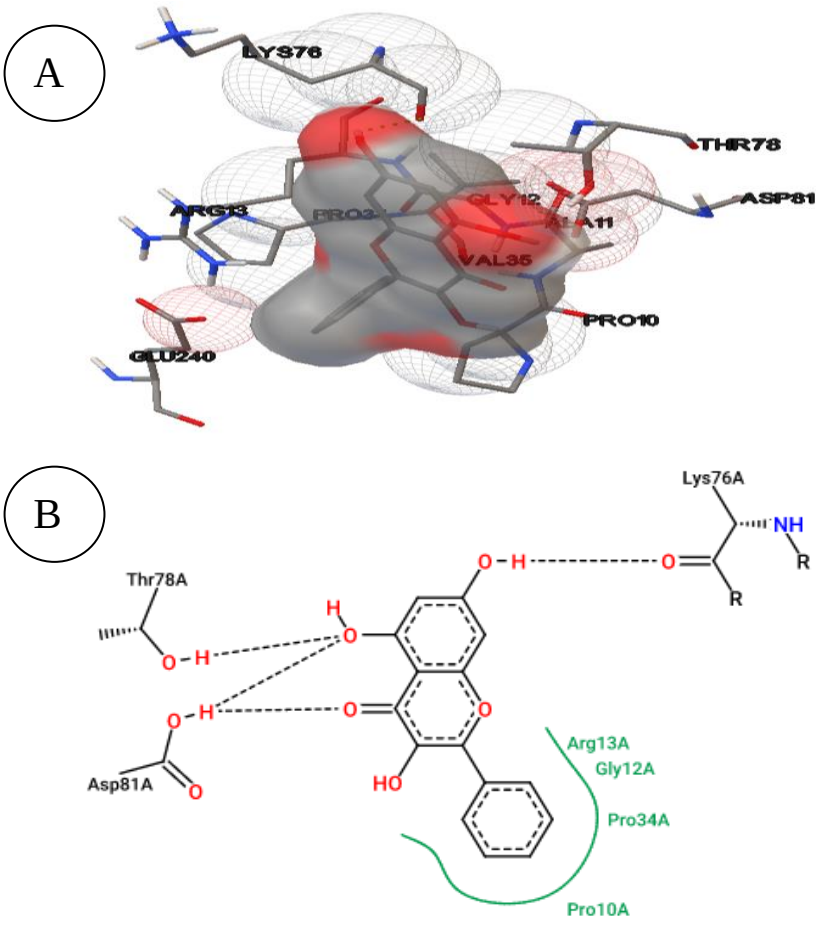
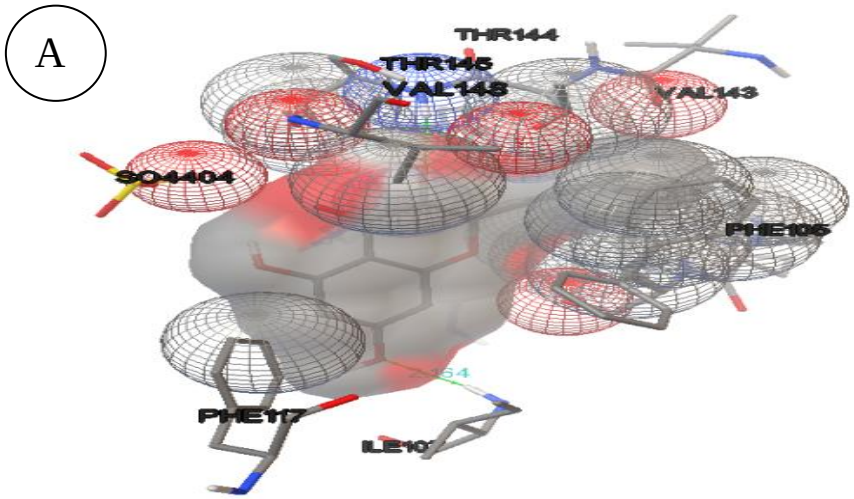


FIG3.28. Interaction entre 2BR6 et TF A 3D et B 2D

3.3.2.4 INTERACTION 1RO5 ET TF

La fixation est se fait par énergie libre -7,2Kcal /mol dont la ligand est se fixe avec les acide amine suivant : **THR144, THR145.**



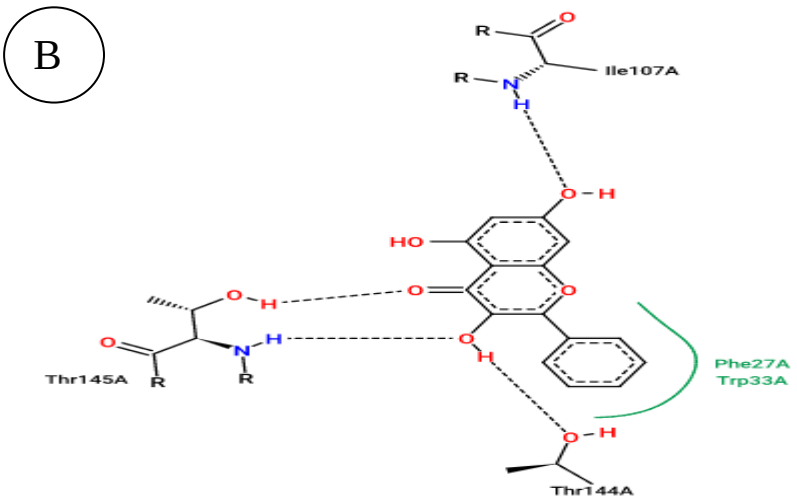


FIG. 3.29 Interaction 1ro5 et TF(A) 3D ET (B) 2D.

3.3.2.5 INTERACTION 2UV0 ET TF

La fixation est se fait entre l'hydrogène de la ligand et 2 acide amine de récepteur **: ARG61** et **GLY54** avec énergie de fixation égale -8.15 KCAL/MOL.

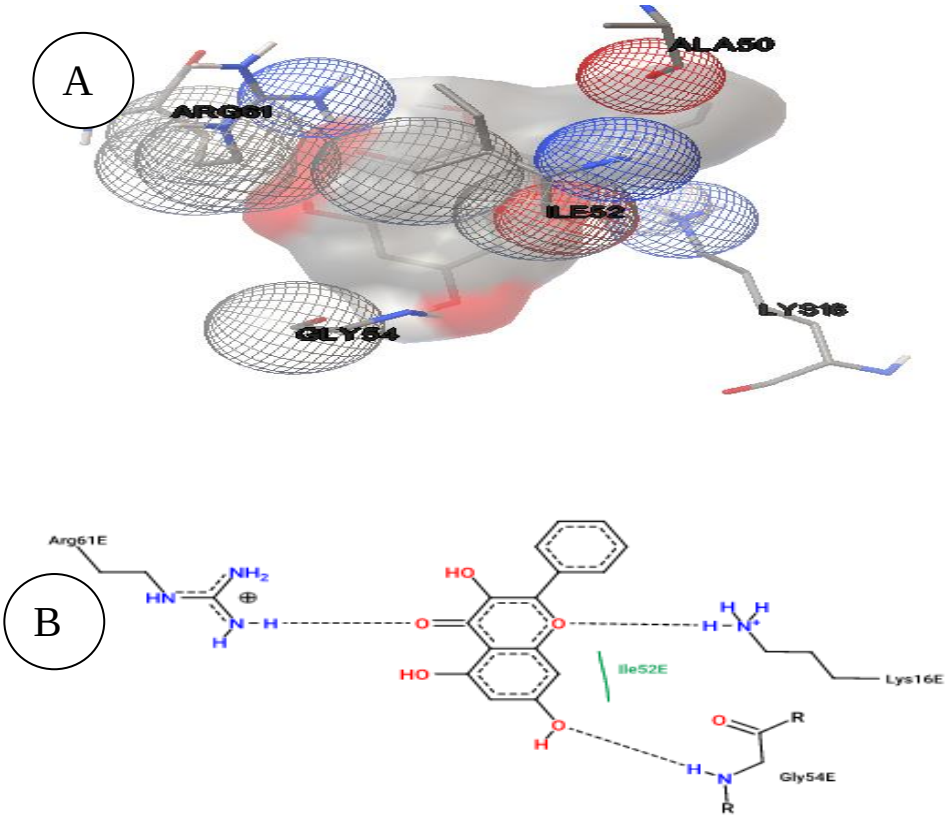


FIG.3.30 interaction entre 2UVO et TF, (A) 3D ET (B) 2D.

3.3.2.6 INTERACTION ENTRE 1KZF ET TF

L'énergie minimale de fixation est égale -7.95 Kcal /mol et se fait par des liaisons hydrogène du ligand et les acides amines suivant : **ARG100** et **ASP48**.

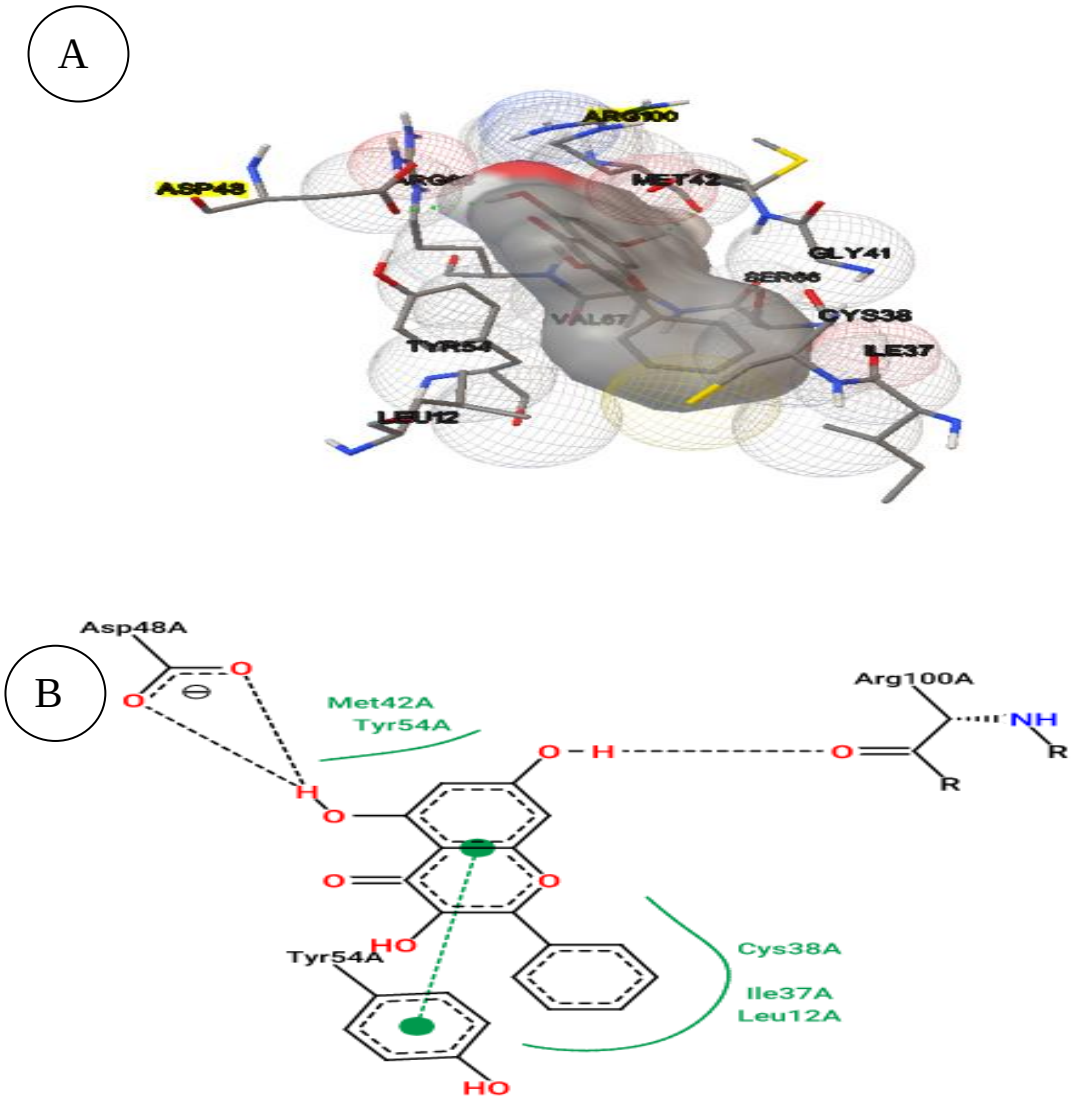


FIG.3.31. Interaction 1KZF ET TF, (A) 3D et (B) 2D.

Avec chaque résultat de conformation on obtenu des histogrammes qui contiens des candidats susceptibles qui interagissent.

Les captures ci-dessous présentes les résultats de conformations des ligands candidats en fonction de l'énergie de chaque interaction. On peut constater que le ligand avec l'énergie minimale présente un bon résultat de conformation ,le ligand avec l'énergie minimale présente un bon résultat de conformation .

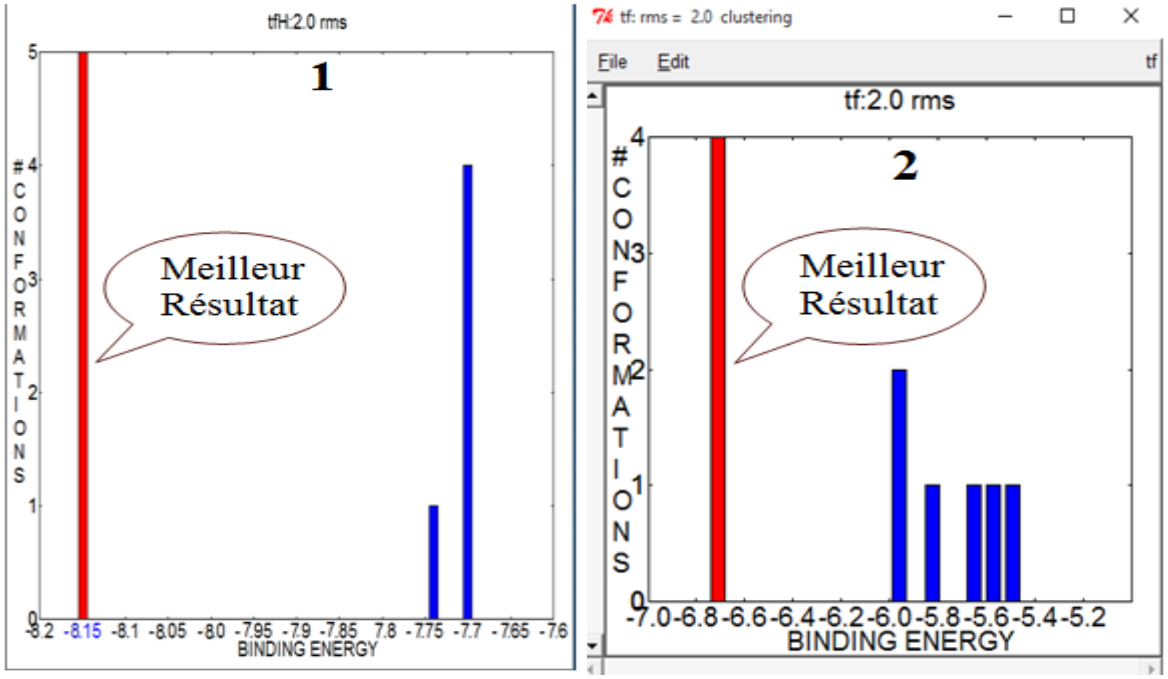


FIG.3.32. Histogramme de résultat de conformation de TF avec (1) 2UV0 et (2) 2BR6 .

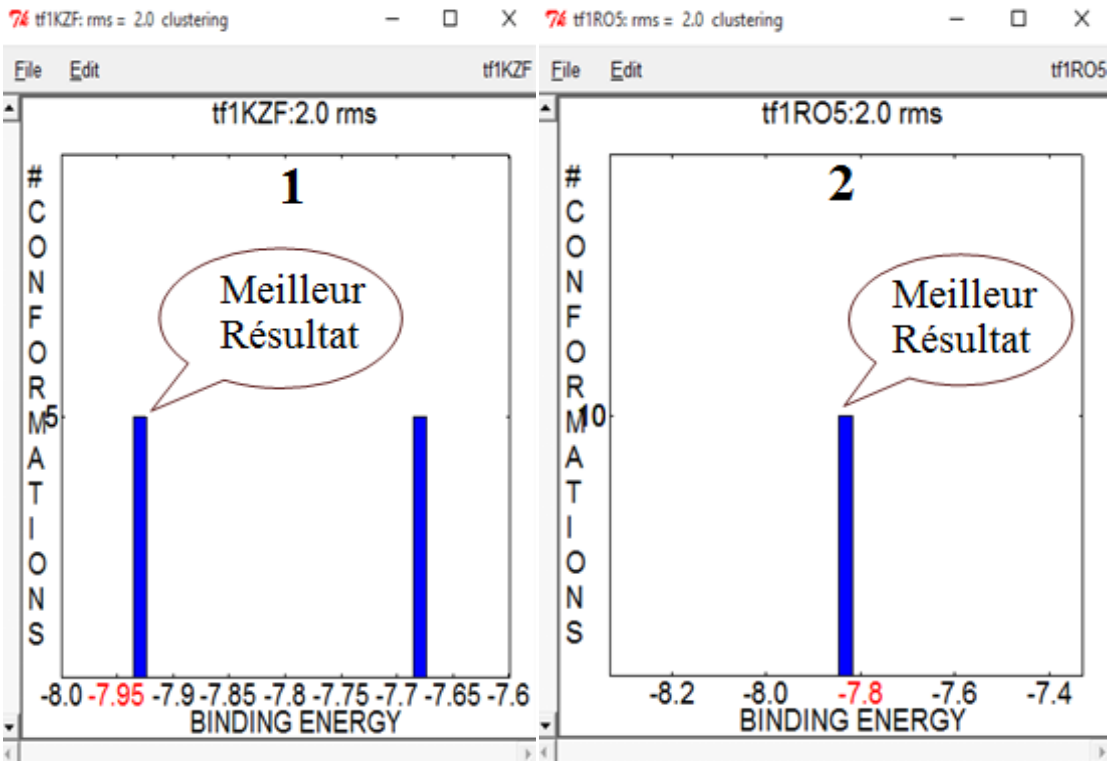


FIG.3.33. Histogramme de résultat de conformation de TF avec (1) 1KZF et (2) 1RO5.

Les résultats du criblage virtuel est enregistrés dans un fichier avec l'extension pdbqt « _VS .pdbqt ». Dans ce fichier on remarque le meilleur ligand candidat, celui avec une énergie minimale par rapport aux autres ligands.

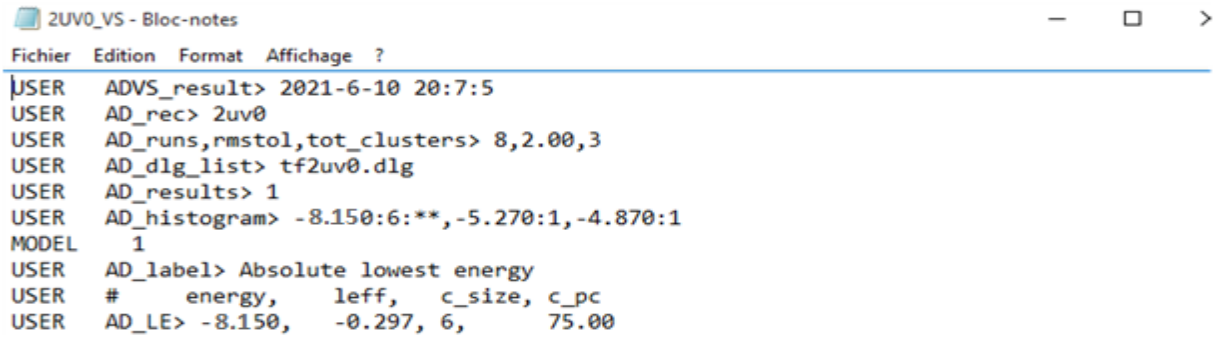


FIG3.34. Résultat final de docking pour 2UV0.

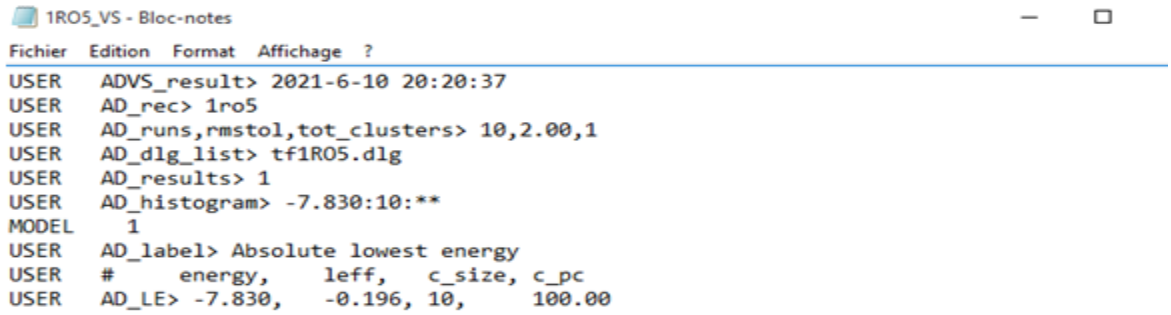


FIG.3.35. Résultat final de docking pour 1RO5.

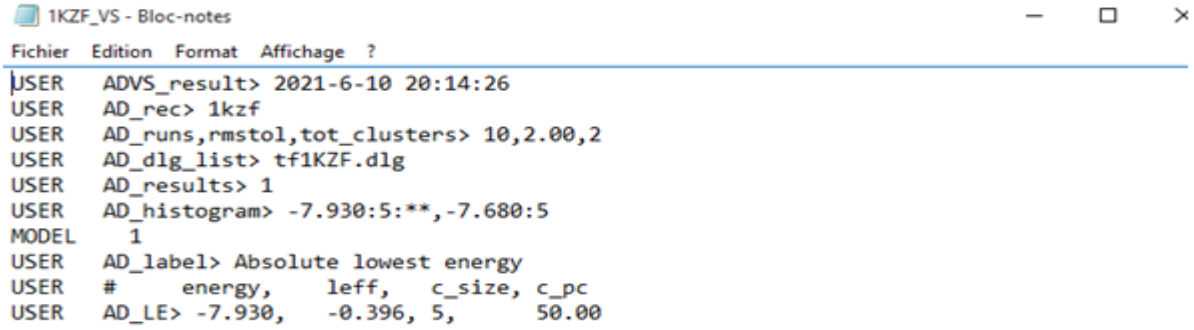


FIG.3.36. Résultat final de docking pour 1KZF.

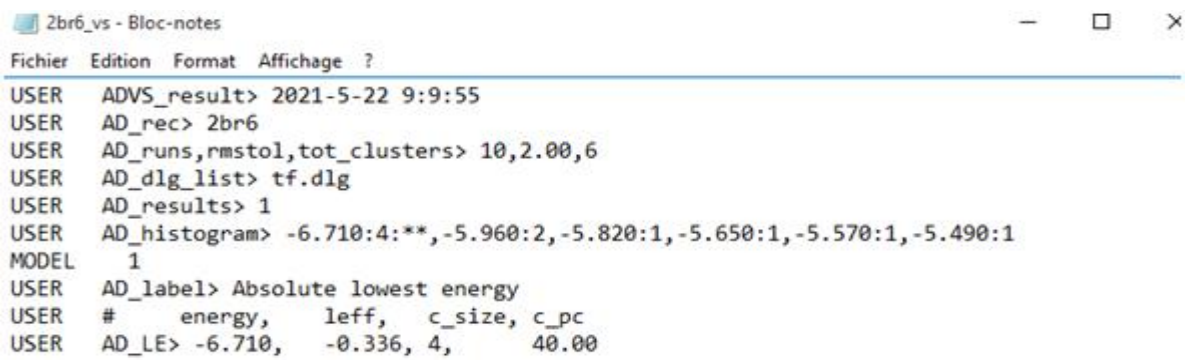


FIG. 3.37. Résultat final de docking pour 2BR6.

TABLEAU 3.3 comparaison de l'énergie de fixation entre les résultats de notre étude et étude littératures.

Protéine	pdb code	énergie de fixation (kcal mol^{-1})	énergie d'après les littératures (kcal mol−1)
AHL	2BR6	- 6.7	−6.06
Las I	1RO5	-7,83	−7.92
Las R l	2UV0	-8.15	−8.03
RhI i	1KZF	-7.93	−7.87

Après la comparaison entre l'énergie de fixation de chaque protéine on observe que : L'interaction d'amarrage entre le TF isolé avec le complexe LasR avait une affinité de liaison plus forte de -8,15 Kcal / mol.

Par conséquent, le TF réduit considérablement les autres protéines de QS comme LasI, LasR et AHLase qui produit les facteurs de virulence chez P.aeruginosa.

Sur la base des études d'amarrage moléculaire le 3, 5, 7-La Trihydroxyflavone peuvent agir comme un agent de détection anti-quorum contre P.aeruginosa et contrôler la formation de bactéries du biofilm.

3.4 COMPARAISON

À travers notre étude et les résultats que on a atteints et comparés aux résultats de littérature, on remarque les résultats ne sont pas précis, malgré que nous avons obtenir le même principe.

Le docking moléculaire est une technologie difficile à mettre en œuvre car elle doit être appliquée et constamment adaptée en fonction du contexte dans lequel le projet se place. Il est néanmoins possible de fournir des guides en fonction du type de protéine, site actif et ligand(s) à ancrer. (*merzoug, 2012*.)

Il existe plusieurs causes erreurs les principales sont :

- Sectionnement faut de site actif par le logiciel.
- Flexibilité de la protéine.
- Influence de l'eau sur la protéine et le ligand utilisé.
- Imprécision des fonctions d'évaluations.
- Interactions non usuelles entre le récepteur et le ligand.
- Flexibilité du ligand.
- Pseudosymétrie du ligand.
- Mauvais jeux de coordonnées (protéine).
- Mauvais types atomiques soit pour le ligand ou la protéine. *(rognan , 2015)*

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Daprès nos recherches sur la littérature, nous avons constaté que les bactéries d'origine hospitaliers provoquent des infections, appelées les infections nosocomiales, qui apparaît au moins 48 heures après l'entrée dans l'hôpital, et désigne une infection associée aux soins, cette infection liés à plusieurs facteurs, cela augmente le risque de contamination par les bactéries.

Ces bactéries sont caractérisées par leur mécanisme de la résistance aux antibiotiques, ca aboutit a des problèmes majeur de santé publique.

Les principaux bactéries, qui ont les plus fréquent et présente la moitié des infections hospitalières sont : *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*.

Plusieurs études sont évaluées l'inhibition de ces bactéries par l'utilisation des nouvelles substances comme les composés de végétal isolé, des extraits et des huiles.

Parmi ces substance acide caféique et gallique qui utilisent comme des inhibiteurs aux efflux pumps de *S.aureus*, Tétrahydropyridine étant candidats comme inhibiteur de l'efflux chez *E.col* et TF qui considéré comme inhibiteur de la formation de biofilm chez *P.aerginosa.*

L'évaluation de l'inhibition de mécanisme de résistance de ces bactéries in vitro se fait selon les recherches littérature et l'inhibition in **silico** se fait par logiciel appelé **AutoDock Tools** consiste à déterminer l'énergie de fixation entre un **ligand** d'une substance isolée et un **récepteur** d'une bactérie, la plus faible énergie d'interaction entre ces deux dernier présente la meilleures résultats pour chaque bactéries

Nous avons obtenu le même principe qui a été précédemment étudié par les chercheurs, mais les résultats ne sont pas précis.

En termes de perspectives d'avenir, ce travail pourra être amélioré par :

- Evalué l'analyse par d'autres logiciels ;
- Etude la fiabilité les programmes par comparative entre les résultats obtenus par AutoDock et d'autres logiciels.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abdel-Halim1et al 2019**. The search of potential inhibitors of the AcrAB–TolC system of multidrug-resistant Escherichia coli: an in silico approach Heba 2019 /Revised: 9 May 2019 /Accepted: 28 May 2019 /Published online: 17 June 2019
2. **Amazian K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L., AbdelmoumèneT., Fabry J., Les membres du réseau NosoMed. 2010.** Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. Eastern Mediterranean Health Journal., 16 : 1070-1078.
3. **Archambaud M. 2009**. Méthodes de l'évalutation de l'activité des antibiotiques in vitro. [Présentation PowerPoint].
4. **Bouguenoun Widad 2017.** Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de guelma.universite badji mokhtar-annaba
5. **Calgagno F., Lacroix R. 2011** P.W. Inhibition of the TetK Pharma-memo Infectiologie. Paris, France : Editions Vernazobres-Greco. 246 p.
6. **CINIAPCA, 2021.** Clinical investigation of nosocomial infections in adult patients after cardiac surgery 2021
7. **Fabry J.,** Les membres du réseau NosoMed. **2010.** Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. Eastern Mediterranean Health Journal., 16 : 1070-1078
8. **Joycy F S Dos Santos, Saulo R Tintino, Thiago S de Freitas, Fábia F Campina, Irwin R de A Menezes, José P Siqueira-Júnior, Henrique D M Coutinho, Francisco A B Cunha 2017. In** vitro e in silico evaluation of the inhibition of Staphylococcus aureus efflux pumps by caffeic and gallic acid. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. Volume 57, April 2018, Pages 22-28.
9. **Gross PA, Van Antwerpen C 2007** Nosocomial infections and hospitaldeaths. A case-control study. Am J Med 2007; 75:658–62
10. **Gallezot G**. **2002** La recherche in silico. Editions du cercle de la librairie; 2002
11. **Glenn T. 2014.** Infections nosocomiales: le respect de l'hygiène des mains par les agents de santé protège les patients. OMS. Genève
12. **Silva L Jr, Carrion LL, von Groll A, Costa SS, Junqueira E, Ramos DF, Cantos J, Seus VR, Couto I, Fernandes LD, Bonacorso HG, Martins MA, Zanatta N, Viveiros M, Machado KS, Almeida da Silva PE 2017** . In vitro and in silico analysis of the efficiency of tetrahydropyridines as drug efflux inhibitors in Escherichia coli. International Journal of Antimicrobial Agents. Volume 49, Issue 3, March 2017, Pages 308-314.
13. **M. Mikulášová, R. Chovanová, 2S. Vaverkova 2016**. Synergism between antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in coping with multidrug-resistant staphylococci, Phytochem. Rev. 15 (2016) 651–662
14. **Ploy Marie-Cécile, 2012.** Nosocomial infections and infection control Aodhan S Breathnach
15. **Qassimi L. 2010**. Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation 2010
16. **RSLF, 2002** Recommandations des experts de la SRLF, Prévention de la transmission croisée en réanimation. 2002; 11: 250-6
17. **Sanjay Sethi mars 2019** Pneumonie nosocomiale
18. **Sekhri A.N. 2011** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de Klebsiella Pneumoniaedans les services a haut risque infectieux au niveau du C.H.U Benbadis de Canstantine.université Mentouri Constantine.187p
19. **Sidi Mohammed Ben Abdellah**. Fes (Maroc). 148p.. propos de 147 cas).
20. **Soilleux M. 2007**. Antibiotiques poly DCEM 1 [En ligne]. Disponible sur http://andre.ar.free.fr/antibiotiques.pdf (Consulté le 17/04/2014)

21. **Sophie, Z, 2014**. La resistance bacterienne aux antibiotiques: Apparition et strategies de lutte
22. **Taleb Ammar 2019**. Incidence et facteurs de risque des infections nosocomiales en reanimation medicale C.H.U tizi-ouzou, These de doctorat en sciences medicales.
23. **Vasudevan A., Mukhopadhyay A., Li J., Yuen E.G., Tambyah P.A. 2014.** A prediction tool for nosocomial multi-drug resistant gram-negative bacilli infections in critically ill patients – prospective observational study.J. BMC. Infect. Dis., 14 (615).
24. **VERT J, 2013** editors. Les applications industrielles de la bioinformatique. Annales des Mines-Réalités industrielles ; 2013: ESKA
25. **Wayne, PA, 2012**. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of Staphylococcus aureus efflux pumps by caffeic and gallic acid
26. **YANG B. 2014**.Analyses bioinformatiques et classements consensus pour les données biologiques à haut débit [UNIVERSITÉ PARIS-SUD; 2014
24. http://prévention des infections nosocomiales livre d'après OMS 2008 PAGE 55 consulté le :
25. http://principaux germes et infections nosocomiales infonosocomiale.fr consulté le :
26. http://d'infections nosocomiales en Algérie : Toute l'actualité sur liberte-algerie.com consulté le :22/06/2021
27. http://autodock.scripps.edu/resources/ consulté le 21/06/2021
28. https://proteins.plus/pages consulté le :22/06/2021
29. http : Inserm - La science pour la sant Infections nosocomiales consulté le :22/06/2021
30. http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application consulté le :22/06/2021
31. https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/risque-des-medicaments/50-interactions consulté le :22/06/2021

INHIBITION IN SILICO ET IN VITRO DE SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINE HOSPITALIERES RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES

RESUME. L'objectif de notre étude est l'évaluation de l'inhibition, in vitro et in silico, de souches bactériennes d'origine hospitalier résistantes aux **antibiotiques** qu'elle devient un problème major dans le monde entier. L'inhibition **in vitro** et **in silico** des mécanismes de résistance de *Escherichia coli, staphylocoque aureus et pseudomonas aerginosa* a montré l'efficacité de les **inhibiteurs acide caféique** et **acide gallique** contre *Staphylocoque aureus*, **Tetrahydropyridine** contre Escherichia *coli* et **Trihydrooxyflavone** contre *Pseudomonas aerginosa.* La base de données d'après la littérature de l'inhibition de résistance **in vitro** se fait par les différentes méthodes de **l'antibiogramme** pour la détermination de concentration minimale inhibitrice (**CMI).**

L'inhibition in **silico se** fait par logiciel appelé **AutoDock Tools** consiste à déterminer l'énergie de fixation entre un **ligand** d'une substance isolée et un **récepteur** d'une bactérie, la plus faible énergie d'interaction entre ces deux derniers présente le meilleur résultat pour chaque bactérie.

MOTS-CLES. Antibiotique, Bactéries résistantes, Inhibition in silico, Inhibition in vitro, Inhibiteur.

.

IN SILICO AND IN VITRO INHIBITION OF BACTERIAL STRAINS OF HOSPITAL ORIGIN RESISTANT TO ANTIBIOTICS

ABSTACT. The aim of our study is to assess the extent of inhibition of **hospital bacteria** resistance **in vitro and in silico** that has become a major problem worldwide, as well as the problem of its inhibition by antibiotics has exacerbated. **In vitro and in silico** studies to inhibit the resistance of each of *Escherichia coli, staphylocoque aureus* and *pseudomonas aerginosa* confirmed the efficacy of each of the following **inhibitors**: **Tetrahydropyridine** against *Escherichia coli*, **Caffeic and Gallic acid** against *staphylococcus aureus*, as well as **Trihydroxyflavone** against *Pseudomonas aeruginosa*.The database according to the sources used of the resistance bacteria is inhibited **in vitro** by several techniques called Antibiogramm, through which the minimum inhibitory concentration is calculated **(MIC)**. **In silico inhibition** that we did was done by a program called **Autodock Tools** that calculates the inhibition energy between the **legend** of isolate substance and the **protein** of bacteria ,the lowest energy of interaction between these two latter presents the best results for each bacteria.

INDEX ENTRIES. Antibiotics, Resistant bacteria, In silico inhibition, In vitro inhibition, Inhibitor.

التثبيط المخبري و الحاسوبي للسلالات بكتيريا المستشفيات المقاومة للمضادات الحيوية

ملخص . الهدف من دراستنا هو تقييم مدى **تثبيط بكتيريا المستشفى المقاومة للمضادات الحيوية حاسوبيا ومخبريا** والذي يمثل مشكل كبير في أنحاء العالم وكذا تفاقم مشكل **تثبيطه بالمضادات الحيوية**. **الدراسة المخبرية والحاسوبية لتثبيط مقاومة** كل من العصيات القولونية والمكورات العنقودية والزائفة الزنجارية أكدت نجاعة كل من المثبطات التالية: رباعي الهيدروبيريدين ضد العصيات القولونية. حمض الكافيك وحمض الغاليك ضد للمكورات العنقودية،وكذا ثلاثي الهيدروكسيفلافون ضد الزائفة الزنجارية. حسب المعطيات المأخوذة من المصادر المستعملة فقد تم تثبيط **مقاومة** البكتيريات **مخبريا** بعدة تقنيات تدعى تحسس الجراثيم **للمضادات الحيوية** حيث يتم من خلالها حساب التركيز التثبيطي الأدنى.

التثبيط الحاسوبي الذي قمنا به تم بواسطة برنامج حاسوبي يدعى **اوتودوك تولز** يقوم بحساب طاقة التثبيط بين **الجند** وكذلك **المستقبل** في البكتيريا وتعد طاقة التثبيط الادنى هي أفضل نتائج المتحصل عليها

كلمات الرئيسية. المقاومة للمضادات الحيوية، المضادات الحيوية، البكتيريا المقاومة ، التثبيط الحاسوبي، التثبيط المخبري.

.