

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

- M^{elle} AZAIZ Amel

- M^{elle} MANSOURI Souad Batoul

Thème

Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne et analyse à
l'échelle atomique de divers conjugués antibiotiques-
polymères

Soutenu publiquement, le : 02/07/2024

Jury :

Grade

President: M^r YEZLI Wassim

« MCA »

Encadrant: M^r BENSAID Mohamed Ouassini

« MCA »

Co-encadrant : M^{lle} BENMESSAOUD Amel

« Doctorante »

Examineur : M^{me} BENGUIAR Rachida

« MCA »

Année universitaire 2023-2024

Remerciements

⊗ Nous tenons tout d'abord à exprimer nos profondes gratitudee à notre encadrant, monsieur **BENSAID Mohamed Ouassini**, pour son encadrement hors pair tout au long de ce mémoire. Sa rigueur scientifique, ses encouragements constants et sa disponibilité ont été essentiels pour la réussite de ce projet. Nous sommes reconnaissantes pour la confiance qu'il nous a accordée et pour les connaissances qu'il a su nous transmettre.

⊗ Nous remercions également notre co-encadrante, **BENMESSAOUD Amel**, pour son soutien précieux et ses conseils avisés. Sa gentillesse et sa patience nous ont permis de surmonter les obstacles rencontrés au cours de notre recherche.

⊗ Nous adressons ensuite nos plus vifs remerciements aux membres du jury, **YEZLI Wassim** et **BENGUIAR Rachida**, pour avoir accepté de présider et de juger ce travail de recherche. Nous sommes honorées par votre présence et par l'intérêt que vous avez porté à notre travail. Vos commentaires et suggestions précieuses vont contribuer à l'amélioration de la qualité de ce mémoire.

§ Dédicace

Louange à dieu seul

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

Ma chère maman, ma raison de vivre, en témoignage de ma reconnaissance pour sa patience, son amour et ses sacrifices.

À mon très chère père pour son amour, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.

À vous, mes parents, je dis merci d'avoir fait de moi celui que je suis aujourd'hui. Aucune dédicace ne pourra exprimer mes respects, mes considérations et ma grande admiration pour vous, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

À mes chères frères Mohamed et Abd el Aour, à ma chère sœur Ilham qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études, que dieu vous garde pour moi, puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

À mes amis, mes enseignants et pour tous ceux qui m'ont donné de l'aide un jour, que dieu vous pays pour tous vos bienfaits.

§ *Dédicace*

§ À mes parents chéris,

§ Le pilier de ma vie, la source de mon amour et de mon inspiration, je vous dédie ce travail en reconnaissance de votre soutien inconditionnel. Vos sacrifices, vos encouragements et vos sages conseils ont été la boussole qui m'a guidé tout au long de mon chemin. Merci pour votre foi inébranlable en moi, même lorsque je doutais de moi-même. Vous êtes mes héros, mes confidents et mes meilleurs amis. Je vous aime plus que les mots ne sauraient l'exprimer.

§ À ma famille aimante,

§ Merci pour votre chaleur, votre compréhension et votre présence constante dans ma vie. Vous êtes mon havre de paix, mon refuge contre les tempêtes de la vie. Je chéris chaque instant passé à vos côtés, rempli de rires, de partages et d'amour inconditionnel. Vous êtes ma force et ma motivation, et je suis reconnaissant pour le lien unique que nous partageons.

§ À mes amis extraordinaires,

§ Vous êtes les rayons de soleil qui illuminent mes journées, les sources de joie et de rires qui rendent la vie belle. Merci pour votre amitié sincère, votre soutien indéfectible et votre capacité à me faire sourire même dans les moments difficiles. Vous êtes une partie précieuse de ma vie, et je suis reconnaissant de vous avoir à mes côtés.

§ **Amel**

Résumé

Le développement de résistances des micro-organismes pathogènes aux antibiotiques a conduit à la recherche de solutions alternatives. Les polymères, tels que le polyéthylène glycol, offrent un potentiel prometteur grâce à leurs propriétés adaptables. Cette étude examine l'efficacité de conjugués PEG2000-Antibiotiques (Chloramphénicol-PEG2000, Rifamycine-PEG2000, Néomycine-PEG2000) contre des bactéries, ainsi que celle du Tioconazole-PEG2000 contre des levures. Les résultats indiquent que les conjugués Chl-PEG, Rifa-PEG, et Neo-PEG présentent une activité antimicrobienne prometteuse contre les souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ces conjugués étaient comparables ou inférieures à celles obtenues par les antibiotiques seuls, grâce à la formation de liaisons hydrogène suffisantes pour un effet bénéfique. En revanche, la combinaison Tio-PEG n'a montré aucun effet contre les deux souches de *Candida albicans*, chaque molécule agissant de manière autonome.

Mots clés : Micro-organismes pathogènes, polyéthylène glycol, antibiotiques, combinaison.

ملخص

أدى تطور مقاومة الميكروبات الممرضة للمضادات الحيوية إلى البحث عن حلول بديلة. وتوفر البوليمرات، مثل الـ polyéthylène glycol ، إمكانيات واعدة بفضل خصائصها القابلة للتكيف. تدرس هذه الدراسة فعالية مركبات Néomycine-، Rifamycine-PEG2000 ، PEG2000-Antibiotiques (Chloramphénicol-PEG2000 (PEG2000 ضد البكتيريا، وكذلك فعالية Tioconazole-PEG2000 ضد الفطريات. تشير النتائج إلى أن مركبات Chl-PEG ، Rifa-PEG ، و Neo-PEG تظهر نشاطًا مضادًا للميكروبات واعدًا ضد السلالات البكتيرية *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* كانت التراكيز المثبطة الدنيا (CMI) لهذه المركبات مماثلة أو أقل من تلك التي تم الحصول عليها بواسطة المضادات الحيوية وحدها، بفضل تشكيل روابط الهيدروجين الكافية لتحقيق تأثير مفيد. بالمقابل، لم تظهر تركيبة Tio-PEG أي تأثير ضد السلالتين من *Candida albicans*، حيث تعمل كل جزيئة بشكل مستقل.

الكلمات المفتاحية: الميكروبات الممرضة، polyéthylène glycol ، Antibiotiques ، التركيبة

Abstract

The development of resistance in pathogenic microorganisms to antibiotics has led to the search for alternative solutions. Polymers, such as polyethylene glycol, offer promising potential due to their adaptable properties. This study examines the efficacy of PEG2000-antibiotic conjugates (Chloramphenicol-PEG2000, Rifamycin-PEG2000, Neomycin-PEG2000) against bacteria, as well as Tioconazole-PEG2000 against yeasts. The results indicate that Chl-PEG, Rifa-PEG, and Neo-PEG conjugates exhibit promising antimicrobial activity against the bacterial strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of these conjugates were comparable to or lower than those obtained with free antibiotics, due to sufficient hydrogen bond formation for a beneficial effect. In contrast, the Tio-PEG combination showed no effect against the two strains of *Candida albicans*, with each molecule acting independently.

Keywords: Pathogenic microorganisms, polyethylene glycol, antibiotics, combination

Sommaire

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des annexes.....	iii
Liste des abréviations.....	iv
1 Introduction	1
2 Matériels et Méthodes	4
2.1 Objectif du Travail.....	4
2.2 Date et Lieu de Travail	4
2.3 Matériels et Produits Utilisés.....	4
2.3.1 Matériels biologiques	5
2.4 Protocole expérimental	6
2.5 Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	6
2.5.1 Préparation de l'inoculum	7
2.5.2 L'antibiogramme	7
2.6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	8
3 Résultats et discussion	10
3.1 Vérification de la pureté des souches	10
3.1.1 Observations macroscopiques	10
3.1.2 Observations microscopiques.....	10
3.2 Détermination des diamètres des zones d'inhibition	11
3.3 Détermination de la CMI	12
3.4 Analyse par dynamique moléculaire des interactions entre les antifongiques et le PEG2000 ainsi que les antibiotiques et le PEG2000	15
4 Discussion	20
5 Conclusion.....	23
6 Références Bibliographiques	25
7 Les Annexes.....	27

Liste des figures

FIGURE 1: SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL	6
FIGURE 4: OBSERVATION MACROSCOPIQUE DES SOUCHES MICROBIENNES UTILISEES.	10
FIGURE 5: OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES SOUCHES MICROBIENNES UTILISEES (G×100)..	11
FIGURE 6: TEST DE MICRODILUTION APRES 24H D'INCUBATION ET TRAITEMENT AVEC LE TTC.	14
FIGURE 7: NOMBRE DE LIAISONS HYDROGENE ENTRE MOLECULES DE CHLORAMPHENICOL ET PEG 2000.	16
FIGURE 8: NOMBRE DE LIAISONS HYDROGENE ENTRE MOLECULES DE RIFAMYCINEET PEG 2000	16
FIGURE 9: NOMBRE DE LIAISONS HYDROGENE ENTRE MOLECULES DE NEOMYCINET PEG 2000.	17
FIGURE 10: NOMBRE DE LIAISONS HYDROGENE ENTRE MOLECULES DE TIOCONAZOLE ET PEG 2000.....	17

Liste des tableaux

TABLEAU 1: MATERIEL, PRODUITS CHIMIQUES ET MILIEUX DE CULTURES UTILISÉS	4
TABLEAU 2: MILIEUX UTILISES POUR LE REPIQUAGE DES SOUCHES TESTEES.....	5
TABLEAU 3:TABLEAU REPRESENTANT LES DIFFERENTES COMBINAISONS POUR CHAQUE FRACTION MOLAIRE ENTRE LE PEG ET LES AGENTS ANTIMICROBIENS.....	9
TABLEAU 4:TEST DE SENSIBILITE DES AGENTS ANTIMICROBIENS VIS-A-VIS DES SOUCHES TESTÉES.....	11
TABLEAU 5: CMIs DES ANTIBIOTIQUES INDIVIDUELS ET EN COMBINAISON AVEC LE PEG2000..	12
TABLEAU 6: CMIs DE L'ANTIFONGIQUE INDIVIDUEL ET EN COMBINAISON AVEC LE PEG2000 SUR <i>C. ALBICANS</i>	13
TABLEAU 7: NOMBRE DE LIAISONS HYDROGENE CREEES PAR DIFFERENTES MOLECULES ANTIMICROBIENNES AVEC LE POLYETHYLENE GLYCOL 2000 : RESULTATS DES SIMULATIONS DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE.....	18
TABLEAU 8: NOMBRE DE MOLECULES ANTIMICROBIENNES FIXEES SUR CHAQUE CHAINE DE POLYETHYLENE GLYCOL 2000 : RESULTATS DES SIMULATIONS DE DYNAMIQUE MOLECULAIRE.....	18
TABLEAU 9: PROPRIETES DES LIAISONS D'HYDROGENES ETABLIES ENTRE LES DIFFERENTES MOLECULES ANTIMICROBIENNES ET LE PEG 2000.....	19

Liste des annexes

ANNEXE1: ÉQUIPEMENT DE LABORATOIRE.....	27
ANNEXE 2: PRODUITS UTILISÉS	28
ANNEXE 3: MILIEUX DE CULTURE.....	29
ANNEXE 4: Test d'antibiogramme qui a été réalisé au laboratoire.....	31
ANNEXE 5: TEST DE MICRODILUTION SUR MICROPLAQUES.....	31
ANNEXE 6: Structure chimique des agents antimicrobiens.....	32
ANNEXE7 : PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	33

Liste des abréviations

- ⊗ **ATF:** Antifongique.
- ⊗ **ATB:** Antibiotique.
- ⊗ **CMI:** Concentration minimale inhibitrice.
- ⊗ **DZI:** Diamètre des zones d'inhibition.
- ⊗ **DMSO:** Diméthylesulfoxyde.
- ⊗ **TTC:** Triphenyltetrazoliumchloride.
- ⊗ **Chl:** Chloramphenicol.
- ⊗ **Rifa:** Rifamycine.
- ⊗ **Neo:** Néomycine.
- ⊗ **PEG2000:** Polyéthylène glycol2000.
- ⊗ **CA:** *Candida albicans*.
- ⊗ **E. coli:** *Escherichia coli*.
- ⊗ **S. aureus:** *Staphylococcus aureus*.
- ⊗ **UFC:** Unité formant colonies.
- ⊗ **PCFF:** Polymer Consistent Force Field.
- ⊗ **NPT:** Nombre d'atomes pression- température constants.

Introduction

1 Introduction

Les infections bactériennes sont aujourd'hui causées par divers microorganismes responsables des maladies infectieuses les plus graves et des épidémies les plus répandues dans le monde. Parmi ces microorganismes, on retrouve la famille des entérobactéries (*Enterobacteriaceae*), qui inclut des bactéries Gram-négatives telles qu'*Escherichia coli*. Cette bactérie est à la fois une commensale, constituant environ 80 % de la flore intestinale aérobie chez l'homme, et une entéro-pathogène pouvant provoquer des maladies de gravité variable, notamment des infections urinaires (**Kaper et al., 2005**). D'autres pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, une bactérie Gram-positive, non encapsulée, non sporulée et immobile, colonisent la cavité nasale, le tube digestif et la flore cutanée (**Bianchi et al., 2013**).

Les infections fongiques, ou mycoses, forment également un ensemble varié de maladies provoquées par des champignons (**Brown et al., 2012**). *Candida albicans*, par exemple, est fréquemment responsable de la candidose, une infection courante chez l'homme, se manifestant par des infections génitales, buccales (muguet) ou systémiques, notamment chez les personnes immunodéprimées (**Mayer et al., 2013**).

La prise en charge de ces infections, qu'elles soient bactériennes ou fongiques, dépend de leur intensité et de leur localisation, nécessitant l'emploi d'agents antimicrobiens spécifiques (**Pappas et al., 2018**). Depuis leur découverte au début du XXe siècle, les antibiotiques ont marqué de grandes avancées thérapeutiques. Leur efficacité dans le contrôle des bactéries pathogènes a contribué à l'éradication de nombreuses maladies infectieuses. Cependant, l'usage abusif et irrationnel de certains antibiotiques a entraîné l'émergence de bactéries résistantes, créant une véritable crise sanitaire. Ces bactéries résistantes limitent la gamme d'antibiotiques disponibles, conduisant à des impasses thérapeutiques (**Pulcini et al., 2010**).

Les antibiotiques peuvent agir sur la synthèse du peptidoglycane, sur la membrane cytoplasmique, sur le métabolisme intermédiaire, sur la synthèse des protéines ou encore sur la synthèse des acides nucléiques. Malheureusement, on assiste aujourd'hui à l'émergence de résistances bactériennes. Les mécanismes de résistance incluent la réduction de la perméabilité membranaire, la production d'enzymes inactivant les antibiotiques, et la modification de la cible de liaison des antibiotiques (**Pulcini et al., 2010**).

L'évolution constante des microorganismes pathogènes et leur capacité à développer des mécanismes de résistance posent un défi majeur pour la santé publique mondiale, compromettant l'efficacité des traitements existants et augmentant la morbidité, la mortalité et les coûts de santé associés aux infections (**Bourgeois, 1999**).

Introduction

Dans ce contexte, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est cruciale. Parmi les approches explorées, l'utilisation de conjugués antibiotique-polymère comme une stratégie prometteuse pour lutter contre les infections résistantes. Ces conjugués combinent les propriétés antimicrobiennes des antibiotiques avec les avantages des polymères, tels que le polyéthylène glycol (PEG), améliorant la solubilité, la biodisponibilité et la distribution tissulaire des médicaments, tout en réduisant leur toxicité (**Thomson, 1997**).

Les conjugués antibiotique-polymère ont également le potentiel de surmonter les mécanismes de résistance bactérienne en contournant les pompes d'efflux et en améliorant la pénétration dans les biofilms bactériens. Ils peuvent prolonger la durée d'action des antibiotiques, réduisant ainsi la fréquence d'administration et améliorant l'observance thérapeutique (Salicylés, AINS).

Cependant, des défis importants subsistent pour maximiser l'efficacité de ces conjugués (**Biyiti et al., 2004**). Comprendre en détail leur activité antimicrobienne et leur comportement à l'échelle atomique est crucial pour optimiser leur conception, leur formulation et leur application clinique. Ainsi, la question centrale de cette étude est la suivante : Comment l'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne et l'analyse à l'échelle atomique des divers conjugués antibiotique-polymère peuvent-elles contribuer à optimiser l'efficacité des traitements antimicrobiens contre les infections résistantes ?

Pour répondre à cette problématique, cette recherche propose une approche multidimensionnelle. Une évaluation *in vitro* approfondie de l'activité antimicrobienne des conjugués sera menée pour déterminer leur efficacité contre une variété de souches bactériennes, y compris celles résistantes aux antibiotiques conventionnels. En parallèle, une analyse à l'échelle atomique sera entreprise pour comprendre les interactions moléculaires entre les conjugués et les micro-organismes.

En intégrant ces données, cette étude visera à formuler des recommandations précises pour optimiser l'efficacité des traitements antimicrobiens. En ajustant les propriétés physicochimiques des conjugués et en ciblant spécifiquement les mécanismes de résistance bactérienne, il sera possible de développer des stratégies thérapeutiques innovantes pour lutter contre les infections résistantes.

En résumé, cette étude aspire à enrichir l'arsenal thérapeutique contre les infections résistantes en exploitant le potentiel des conjugués antibiotique-polymère. En combinant une évaluation *in vitro* approfondie et une analyse à l'échelle atomique, elle vise à ouvrir de nouvelles

Introduction

perspectives dans la lutte contre les infections résistantes, améliorant ainsi la santé et le bien-être des patients.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

2 Matériels et Méthodes

2.1 Objectif du Travail

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer in vitro l'activité antimicrobienne de trois antibiotiques et d'un antifongique, tant individuellement qu'en combinaison avec le polyéthylène glycol 2000 (PEG 2000), contre deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) et deux souches de *Candida albicans*. Ces évaluations visent à comparer l'efficacité des agents antimicrobiens libres par rapport à leurs conjugués avec le PEG 2000, en analysant les zones d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

2.2 Date et Lieu de Travail

Le travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret, durant la période du 18 février 2024 au 20 mars 2024.

2.3 Matériels et Produits Utilisés

L'ensemble des produits, verreries et appareillages utilisés dans notre travail expérimental sont cités dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Matériel, produits chimiques et milieux de cultures utilisés

Matériels et appareillages	Produits chimiques et milieux de culture	Autres
-Agitateur magnétique	-Polyéthylène glycol 2000	-Tubes à essais
-Thermomètres (Stuart) + (Kira)	-Chloramphénicol	-Microplaques à 96 puits
-Autoclave (wolf)	-Rifamycine	-Boîtes de Petri
-Bain-Marie	-Néomycine	-Écouvillons
-Balance magnétique (Kernew)	-Tioconazole	-Eau physiologique
-Incubateur à 37°C (Nuve)	- BHI Bouillon	-Eau distillée
-Micropipettes	- Sabouraud bouillon	- DMSO
-Bec Bunsen	- Gélose nutritive	
-Vortex (Vibrofix électronique VF1)	-Gélose Sabouraud	
-Spectrophotomètre UV-Visible (Jenway 7305).		

Matériels et Méthodes

2.3.1 Matériels biologiques

Pour réaliser ce travail, deux souches bactériennes et deux souches fongiques de référence ont été sélectionnées (Tableau 2). Les souches ont été conservées à -20 °C dans un milieu composé de 50 % de glycérol et de 50 % de bouillon BHI (Brain Heart Infusion). Pour leur réactivation, elles ont été repiquées sur des milieux sélectifs, puis examinées macroscopiquement et microscopiquement pour vérifier leur pureté.

Tableau 2: Milieux utilisés pour le repiquage des souches testées.

Espèces microbiennes	Référence	Type de Gram	Milieux de culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC43300	Positif	Chapman
<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	Négatif	Mac Conkey
<i>Candida albicans</i> (M3)	ATCC10237	Positif	Sabouraud-Chloramphénicol-actidione
<i>Candida albicans</i> (CA)	ATCC10231		

Matériels et Méthodes

2.4 Protocole expérimental

Le protocole expérimental suivi dans cette étude est illustré dans le schéma suivant :

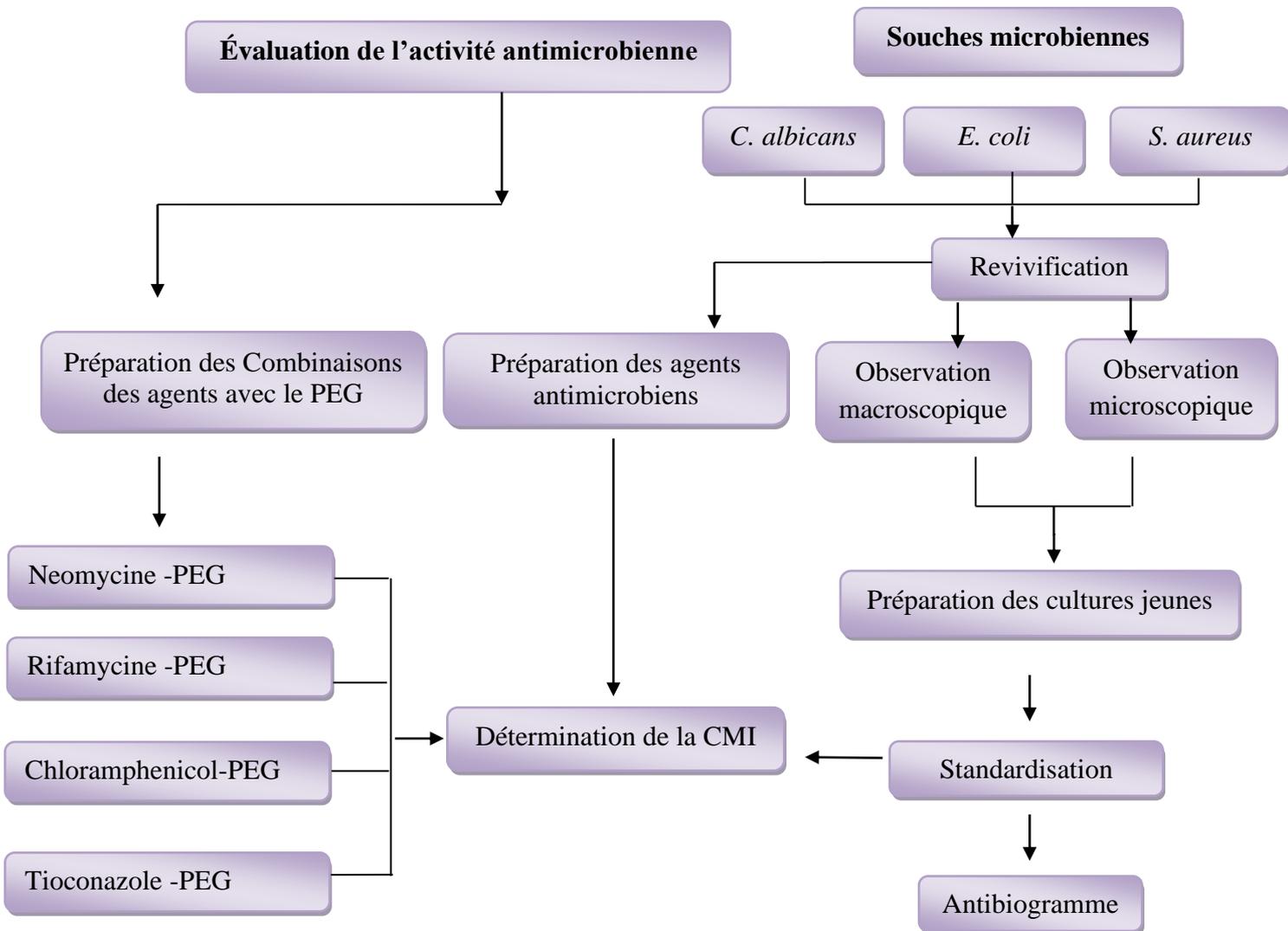


Figure 1: Schéma du protocole expérimental.

Matériels et Méthodes

2.5 Évaluation de l'activité antimicrobienne

Les méthodes utilisées pour évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et aux antifongiques se divisent en deux catégories : directes et indirectes. Les méthodes directes, telles que la micro-dilution en milieu liquide, mesurent la concentration minimale inhibitrice de chaque antibiotique. En revanche, les méthodes indirectes évaluent la sensibilité et la résistance des souches bactériennes en fonction de certains paramètres, comme le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imprégnés d'antibiotique. Parmi ces méthodes indirectes figure la diffusion en gélose (**Thabaut & Durosoir, 1979**).

2.5.1 Préparation de l'inoculum

À partir des cultures jeunes obtenues après 18 heures d'incubation, 2 à 3 colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et suspendues dans 9 ml d'eau physiologique. Ensuite, elles ont été agitées avec un vortex. Les solutions ont été ajustées jusqu'à obtenir une charge microbienne de 10^6 UFC/ml, mesurée dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 525 nm pour les solutions bactériennes, correspondant à une densité optique entre 0,08 et 0,14, et à une longueur d'onde de 630 nm pour les solutions fongiques, correspondant à une densité optique de 0.15 (**Mendoza-Juache et al., 2017**).

2.5.2 L'antibiogramme

L'antibiogramme est un test essentiel pour évaluer le niveau de résistance et de sensibilité des micro-organismes pathogènes à divers agents antimicrobiens (**Marcel, 2005**). Dans cette étude, la sensibilité des isolats de levures et de bactéries aux agents antimicrobiens a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque, conformément aux directives du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Les antibiotiques utilisés pour ce test sont le Chloramphénicol (30 μ g), la Néomycine (20 μ g), la Rifamycine (20 μ g) et un antifongique, le Tioconazole (10 μ g).

Pour préparer les milieux de culture, la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et la gélose Sabouraud pour les champignons ont été liquéfiées à 95 °C pendant 10 minutes, puis versées dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à raison de 10 ml par boîte, et laissées à solidifier. À partir de cultures jeunes standardisées (10^6 UFC/ml), les boîtes ont étéensemencées par écouvillonnage, puis laissées à sécher pendant 20 minutes. Ensuite, des disques d'antibiotiques ont été placés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince métallique stérile. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures.

Matériels et Méthodes

Pour évaluer la sensibilité, l'intermédiaire ou la résistance des isolats vis-à-vis des agents testés, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et comparés aux valeurs seuils des zones interprétatives standardisées, conformément aux directives CLSI M44-A2 et ROSCO Diagnostica (**Rosco, 2011**).

2.6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Différentes fractions molaires de 100/0 %, 50/50 %, 30/70 % et 70/30 % ont été préparées pour les conjugués (PEG-antibiotique) et (PEG-antifongique) afin d'évaluer leur activité antimicrobienne. Le tableau 3 présente les diverses combinaisons pour chaque fraction molaire entre le PEG et les agents antimicrobiens pour une solution mère de 1 mg/ml.

La méthode de microdilution décrite par **Seddiki et al. (2015)** a été employée pour ce test. Cette méthode utilise des microplaques en polystyrène à 96 puits. Les microplaques ont été divisées en 4 sections pour les 4 fractions molaires (0/100 %, 70/30 %, 50/50 %, 30/70 %), chaque fraction étant répétée deux fois. Une solution de chaque combinaison à différentes fractions molaires a été distribuée dans le premier puits de chaque rangée de la plaque. Ensuite, 100 µl de bouillon BHI ont été ajoutés à tous les puits, suivis d'une dilution 1/2 de puits en puits, allant du premier au dixième puits, créant ainsi une gamme de 10 concentrations de 128 à 0,125 µg/ml. Les onzième et douzième puits servent de témoins négatif et positif.

Ensuite, 100 µl de la suspension microbienne (composée de 10 µl de la suspension standardisée à 10^5 UFC et 90 µl de bouillon BHI) ont été ajoutés. Les microplaques ont été soigneusement scellées et incubées à 37°C pendant 22 heures. Après l'incubation, 40 µl de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) (2 mg/ml) ont été ajoutés à tous les puits. Les plaques ont été ré-incubées à température ambiante dans l'obscurité pendant 2 heures. Un changement de couleur vers le rouge du TTC indique une croissance bactérienne (**Lakhdar et al., 2017**). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance visible d'un inoculum bactérien standardisé en 18 h.

Matériels et Méthodes

Tableau 3: Tableau représentant les différentes combinaisons pour chaque fraction molaire entre le PEG et les agents antimicrobiens.

Fraction Molaire (%)	Chloramphenicol			Néomycine			Rifamycine			Tioconazole		
	PEG	ATB	VF (ml)	PEG	ATB	VF (ml)	PEG	ATB	VF (ml)	PEG	ATF	VF (ml)
100/0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
70/30	3.6	1.4	5	2.9	2.1	5	2.7	2.3	5	3.4	1.6	5
50/50	8.6	1.4	10	3.8	1.2	5	3.7	1.3	5	8.4	1.6	10
30/70	15.0	1.0	16	8.8	1.2	10	8.7	1.3	10	13.8	1.2	15

PEG : Polyéthylène glycol 2000, ATB : antibiotique ; ATF : antifongique ; VF : Volume final.

Résultats et discussion

3 Résultats et discussion

3.1 Vérification de la pureté des souches

Les figures 4 et 5 présentent les observations macroscopiques et microscopiques des souches d'*E. coli*, de *S. aureus* et de *C. albicans* après leur repiquage sur des milieux de culture appropriés. Les caractéristiques morphologiques des colonies observées correspondent aux descriptions trouvées dans la littérature scientifique, confirmant ainsi la pureté de chaque souche.

3.1.1 Observations macroscopiques

Les colonies d'*E. coli* apparaissent typiquement lisses et de couleur rose, tandis que celles de *S. aureus* sont rondes, opaques et de couleur dorée. Les colonies de *C. albicans* se distinguent par leur aspect crémeux et blanc.



Figure 2: Observation macroscopique des souches microbiennes utilisées.

3.1.2 Observations microscopiques

Les examens au microscope révèlent la morphologie cellulaire spécifique de chaque microorganisme. Les cellules d'*E. coli* se présentent sous forme de bacilles droits à Gram négatif, *S. aureus* apparaît en cocci disposés en amas caractéristiques à Gram positif, et *C. albicans* montre des cellules levuriformes ovales, parfois avec la présence de pseudohyphes.

Résultats et discussion

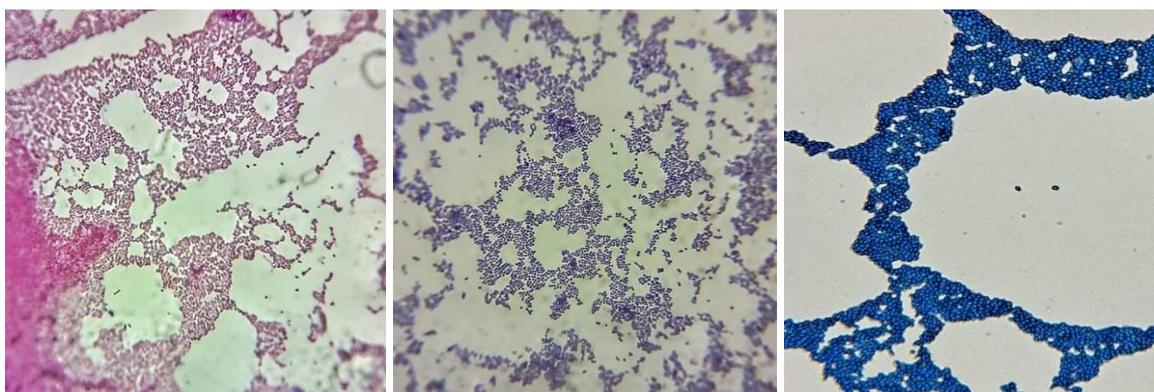


Figure 3 : Observation microscopique des souches microbiennes utilisées (G×100).

3.2 Détermination des diamètres des zones d'inhibition

Le Tableau 4 présente les résultats du test de sensibilité des souches bactériennes et des deux souches de *C. albicans* aux agents antimicrobiens. Selon les résultats obtenus, *S. aureus* s'avère être la souche la plus sensible aux antibiotiques, avec des zones d'inhibition de 33 mm pour la Rifamycine et 31 mm pour le Chloramphénicol. *E. coli* suit avec des zones de 13 mm et 22 mm respectivement. La Néomycine a montré une sensibilité similaire pour les deux souches, avec une zone d'inhibition de 12 mm pour *S. aureus* et de 16 mm pour *E. coli*.

Parallèlement, une sensibilité intermédiaire des souches fongiques à l'antifongique Tioconazole a été observée, avec des zones d'inhibition de 14,3 mm pour la souche M3, suivie par une zone de 13,3 mm pour la souche CA.

Tableau 4: Test de sensibilité des agents antimicrobiens vis-à-vis les souches testées.

Agents antimicrobiens	DZI (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i> (M3)	<i>C. albicans</i> (CA)
Chloramphénicol	22 ± 0,3	31 ± 0,2	-	-
Rifamycine	13 ± 0,2	33 ± 0,1	-	-
Néomycine	16 ± 0,1	12 ± 0,1	-	-
Tioconazole	-	-	14,3 ± 0,6	13,3 ± 0,6
PEG 2000	0	0	0	0

Résultats et discussion

3.3 Détermination de la CMI

Le Tableau 5 présente les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques Chloramphénicol (CHL), Rifamycine (RIF) et Néomycine (NEO), seuls et en combinaison avec le PEG2000, vis-à-vis des bactéries *E. coli* et *S. aureus*. Pour le CHL, la CMI est de 4 µg/ml pour les deux espèces bactériennes. Une combinaison bénéfique a été observée entre le PEG 2000 et le Chloramphénicol (CHL-PEG2000 à la fraction molaire 70/30) chez *S. aureus*, avec une CMI similaire à celle obtenue pour l'antibiotique seul. Cependant, cette combinaison s'est révélée indifférente chez *E. coli*, avec une CMI de 8 µg/ml.

Pour le RIF, la CMI est de 8 µg/ml. La combinaison avec le PEG 2000 (RIF-PEG2000) a montré une CMI similaire à celle de l'antibiotique seul pour *E. coli* à la fraction molaire 70/30, ce qui rend cette combinaison bénéfique. Pour les autres proportions, des valeurs de CMI plus élevées ont été enregistrées pour les deux antibiotiques.

La NEO présente une CMI de 4 µg/ml sur *E. coli* et de 2 µg/ml sur *S. aureus* (Figure 6). Pour la combinaison NEO-PEG2000, quelle que soit la fraction molaire (70/30, 50/50, 30/70), les valeurs de CMI étaient supérieures à celles de l'antibiotique seul pour les deux souches bactériennes.

Tableau 5 : CMI des antibiotiques individuels et en combinaison avec le PEG2000.

Combinaisons	CMI (µg/ml)				
	Fraction molaire (%)	<i>E. coli</i>	Interprétation	<i>S. aureus</i>	Interprétation
Chloramphénicol/ PEG	100/0	4	Négatif	4	Positif
	70/30	8		4	
	50/50	32		8	
	30/70	32		16	
Rifamycine/PEG	100/0	8	Positif	8	Négatif
	70/30	8		16	
	50/50	16		16	

Résultats et discussion

	30/70	34		32	
Néomycine/PEG	100/0	4	Négatif	2	Négatif
	70/30	8		4	
	50/50	16		8	
	30/70	32		16	

Le Tableau 6 illustre les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du Tioconazole contre deux souches de *C. albicans*, M3 et CA, ainsi que leurs CMI en combinaison avec le PEG2000. La souche CA a montré une CMI de 8 µg/ml, tandis que la souche M3 a présenté une CMI de 16 µg/ml. Pour toutes les combinaisons du Tioconazole avec le PEG2000, des CMI plus élevées ont été observées par rapport à l'antifongique seul pour les deux souches, indiquant une diminution de l'efficacité de l'antifongique lorsqu'il est combiné avec le PEG2000.

Tableau 6 : CMI de l'antifongique individuel et en combinaison avec le PEG2000 sur *C. albicans*.

Combinaisons	CMI (µg/ml)				
	Fraction molaire (%)	M3	Interprétation	CA	Interprétation
Tioconazole/PEG	100/0	16	Négatif	8	Négatif
	70/30	64		32	
	50/50	128		64	
	30/70	250		128	

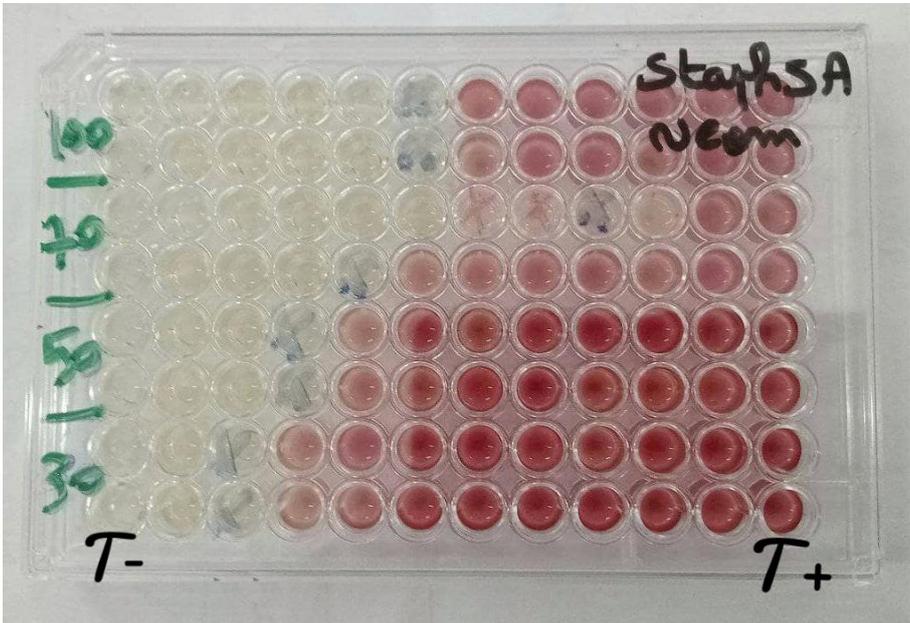


Figure 4 : Test de microdilution après 24h d'incubation et traitement avec le TTC.

Résultats et discussion

3.4 Analyse par dynamique moléculaire des interactions entre les antifongiques et le PEG2000 ainsi que les antibiotiques et le PEG2000

Afin de mieux comprendre les interactions physiques au niveau atomique des combinaisons (Chl-PEG), (Rifa-PEG), (Neo-PEG) et (Tio-PEG), une étude de dynamique moléculaire a été réalisée en utilisant le champ de force PCFF (Polymer Consistent Force Field). L'objectif était d'analyser la structure finale et de décrire les diverses interactions.

Les résultats montrent les effets synergiques de différentes combinaisons de molécules dans un système moléculaire simulé, évalués en termes du nombre de liaisons hydrogène formées par molécule. La combinaison Chloramphenicol-PEG, présentée dans la figure 7, établit deux fortes liaisons hydrogéniques. Cela suggère que l'association du PEG avec les molécules de Chloramphenicol génère un effet synergique quantifiable

En revanche, la combinaison Rifamycine-PEG, qui génère 4 liaisons hydrogène comme illustré dans la figure 8, montre un effet synergique notable. Cette observation suggère que ces molécules interagissent de manière à augmenter considérablement le nombre de liaisons hydrogène, ce qui pourrait renforcer leur activité ou leur stabilité.

De même, la combinaison Néomycine-PEG produit 8 faibles liaisons hydrogène (figure 9), indiquant un effet synergique qui pourrait améliorer leur efficacité ou leurs propriétés dans le système.

Lorsque les molécules se combinent pour former ces associations, cela entraîne une augmentation tant de la taille que du poids moléculaire généré. Autrement dit, ces interactions entre molécules conduisent à la formation d'une entité plus grande et plus lourde que les molécules individuelles avant leur interaction, en plus d'améliorer la solubilité hydrosoluble du PEG2000. Ainsi, la performance accrue observée des nouvelles molécules (Rifamycine-PEG), (Néomycine-PEG), (Chloramphénicol-PEG) sur nos souches analysées est justifiée.

Parallèlement, la figure 10 montre qu'aucune liaison hydrogène n'est formée dans la combinaison de l'antifongique Tioconazole avec le PEG2000, indiquant l'absence d'effet synergique. Dans cette configuration, les molécules agissent de manière indépendante sans interaction synergique notable.

En résumé, les résultats démontrent que les effets synergiques dans ce système dépendent fortement des interactions spécifiques entre les molécules impliquées, notamment les liaisons hydrogène. Les combinaisons de PEG avec la Rifamycine, la Néomycine et le Chloramphénicol montrent des effets synergiques prometteurs, exploitables potentiellement

Résultats et discussion

en chimie et en pharmacologie, tandis que d'autres combinaisons comme avec le Tioconazole ne montrent pas d'effet synergique significatif dans cette étude simulée.

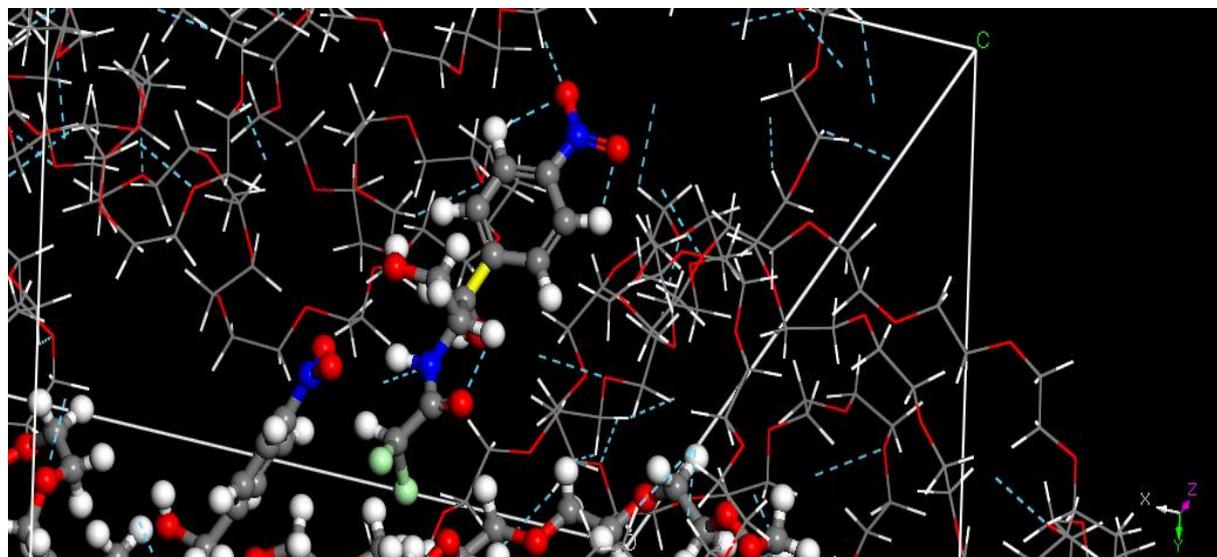


Figure 5: Nombre de Liaisons Hydrogène entre Molécules de Chloramphenicol et PEG 2000.

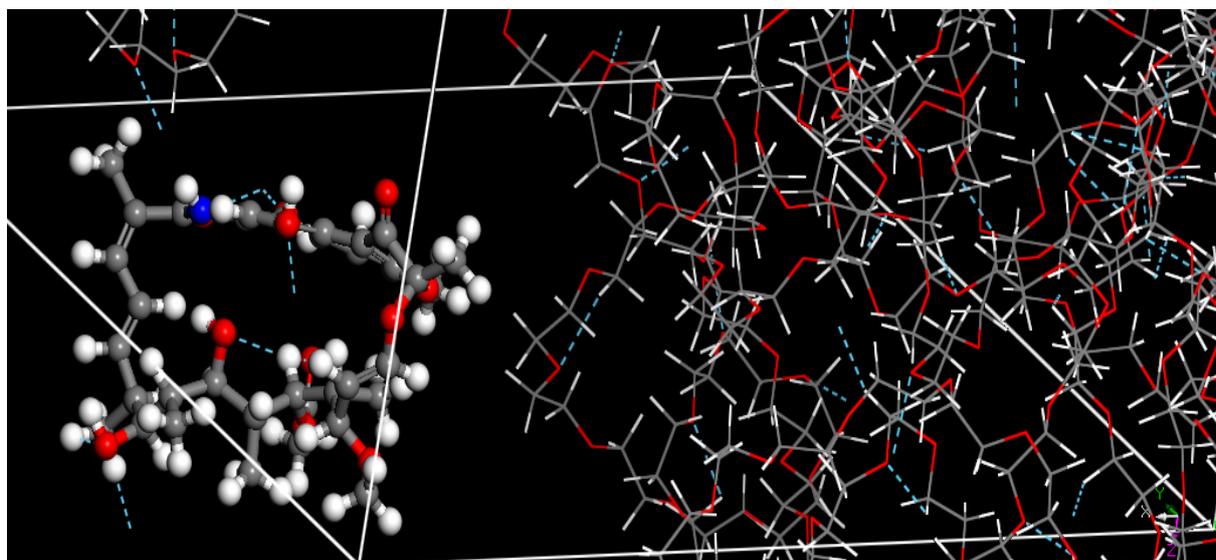


Figure 6: Nombre de Liaisons Hydrogène entre Molécules de Rifamycine et PEG 2000

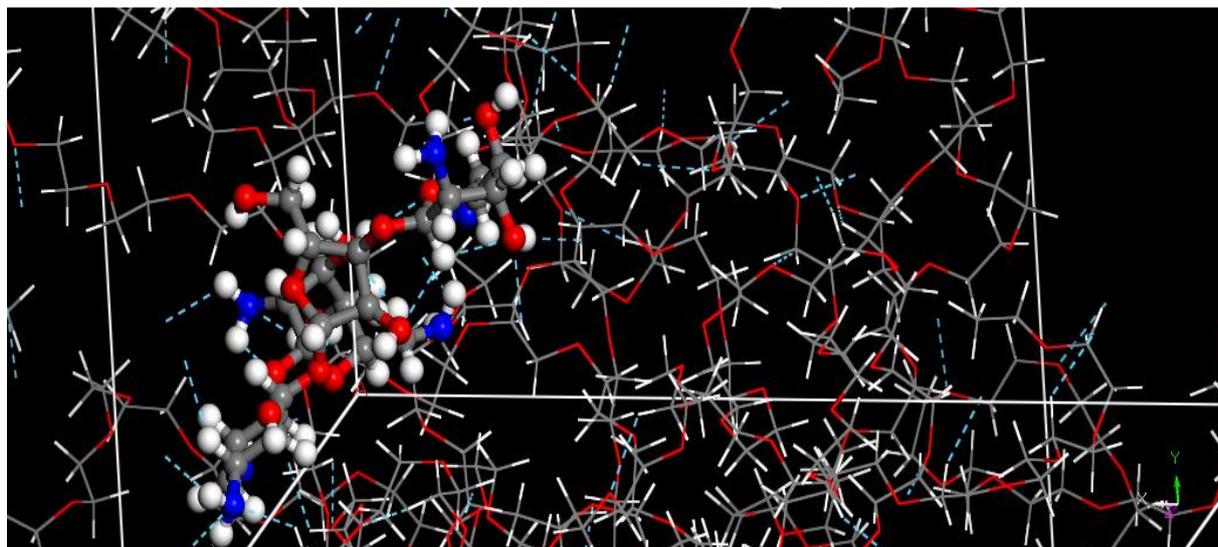


Figure 7: Nombre de Liaisons Hydrogène entre Molécules de Neomycinet PEG 2000.

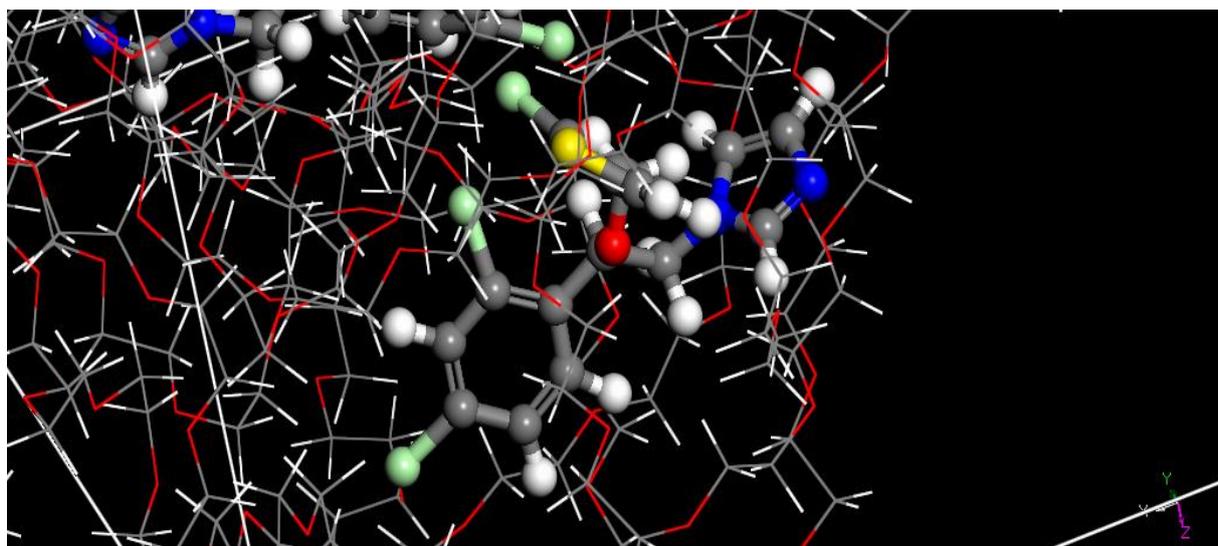


Figure 8: Nombre de Liaisons Hydrogène entre Molécules de Tioconazole et PEG 2000.

Résultats et discussion

Tableau 7: Nombre de Liaisons Hydrogène Créées par Différentes Molécules Antimicrobiennes avec le Polyéthylène Glycol 2000.

système moléculaire	Boite de simulation	Nombre de liaisons hydrogène créés par molécule
1	4 chaînes PEG +2molécules Chloramphénicol	2
2	4 chaînes PEG +2 molécules Rifamycine	4
3	4 chaînes PEG +2 molécules Néomycine	8
4	4 chaînes PEG +2 molécules Tioconazole	0

Tableau 8: Nombre de Molécules Antimicrobiennes Fixées sur Chaque Chaîne de Polyéthylène Glycol 2000 : Résultats des Simulations de Dynamique Moléculaire.

système moléculaire	Boite de simulation	Nombre de molécules fixées par chaîne de PEG2000	Effet synergique (Validé expérimentalement)
1	1 chaîne PEG +20 molécules Chloramphenicol	2	Effet remarquable
2	1 chaîne PEG +20 molécules Rifamycine	7	Effet remarquable
3	1 chaîne PEG +20 molécules Néomycine	10	Effet indifférent
4	1 chaîne PEG +20 molécules Tioconazole	0	Aucun effet combiné

La force de la liaison hydrogène dépend de l'électronégativité des atomes; le Tableau 9 classe les liaisons hydrogène relevées entre nos combinaisons comme fortes ou faibles en fonction de l'énergie de la liaison, qui varie respectivement de 40 à 15 kcal mol⁻¹. Cette analyse nous permettra de juger si les molécules antimicrobiennes établissent des liaisons physiques fortes avec notre polymère (PEG), ce qui déterminera si la molécule antimicrobienne se fixe efficacement sur le polymère ou pas.

Résultats et discussion

Tableau 9: Propriétés des liaisons d'hydrogènes établies entre les différentes molécules antimicrobiennes et le PEG 2000.

Composé chimique	Type de liaison d'hydrogène	Énergie de liaison (kJ.mol ⁻¹)	Caractérisation
Chloramphenicol...PEG2000	O=NO...HCO	40	Modérément forte à forte
	O=CN...HCO	25	Modérée à forte
Néomycine...PEG2000	CCN...HCO	12	Faible à modérée
	CO...HC	20	Modérée à forte
	OH...OC	20	Modérée à forte
	NCH...OC	15	Faible à modérée
	NH...OC	15	Faible à modérée
Rifamycine...PEG2000	HCO...HCH	20	Modérée à forte
	NCO...HCH	20	Modérée à forte
	CH...OC	15	Faible à modérée
Tioconazole...PEG2000	Aucune	-	-

Discussion

4 Discussion

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des agents thérapeutiques Chloramphénicol, Rifamycine, Néomycine ainsi que du médicament antifongique Tioconazole vis-à-vis des souches microbiennes *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*, un test d'antibiogramme par diffusion en disque a été réalisé. Ce test a permis de déterminer la susceptibilité des souches microbiennes aux agents antimicrobiens testés en évaluant visuellement les zones d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques imprégnés de ces substances. Les résultats ont montré une sensibilité de toutes les souches microbiennes étudiées aux agents antimicrobiens testés. En particulier, la souche de *S. aureus* a manifesté une sensibilité au Chl et à la Rif, avec des diamètres d'inhibition compris entre 31 et 33 mm. De même, la Néo a démontré une sensibilité similaire envers les deux souches bactériennes. En revanche, les souches fongiques de *C. albicans* (CA et M3) ont montré une réponse intermédiaire à l'antifongique tioconazole, avec des diamètres d'inhibition oscillant entre 13 et 14 mm. **Alhussaini (2013)** a observé une gamme d'efficacité du tioconazole contre différentes souches de *C. albicans*, avec des zones d'inhibition mesurant de 0 à 35 mm, certaines souches montrant une sensibilité résistante, intermédiaire ou susceptible.

Une enquête a été menée impliquant 15 laboratoires spécialisés en bactériologie, évaluant la sensibilité antimicrobienne de cultures de *S. aureus* et *E. coli* par la méthode de diffusion sur disque, conforme aux protocoles standardisés de chaque laboratoire. Jusqu'à 28 agents antimicrobiens différents ont été testés, incluant le Chloramphénicol et la Néomycine avec des diamètres d'inhibition moyens de 3 mm et de 2 mm, respectivement (**Whithear et al., 1985**).

Des calculs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) ont été réalisés en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide. Les résultats ont démontré l'efficacité de chaque antibiotique et antifongique testé contre les deux souches bactériennes et les souches levuriennes. L'antibiotique Chl a montré une CMI de 4 µg/ml contre les deux souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus*, tandis que la Rif a présenté une CMI de 8 µg/ml contre ces mêmes bactéries. Pour la Néomycine, la CMI était de 4 µg/ml contre *E. coli* et de 2 µg/ml contre *S. aureus*. Quant à l'antifongique Tioconazole, sa CMI était de 16 µg/ml contre la souche M3 et de 8 µg/ml contre la souche CA. Ces résultats soulignent la capacité des substances testées à inhiber la croissance des micro-organismes évalués, mettant en lumière leur potentiel dans le cadre de thérapies antimicrobiennes.

Une étude a été menée pour investiguer le profil de sensibilité et de résistance des isolats de

Résultats Discussion

S. aureus à divers antibiotiques, y compris la Néomycine. Cinquante isolats bactériens ont été collectés à partir d'échantillons variés soumis au laboratoire chimique de l'Institut Pakistanais des Sciences Médicales à Islamabad (PIMS). Parmi ces isolats, 19 (soit 63 %) ont été identifiés comme résistants à la Néomycine, présentant des CMI de Néo de 2 µg/ml (**Safama et al., 2005**).

L'objectif de cette étude était d'évaluer expérimentalement l'activité antimicrobienne et d'analyser à l'échelle atomique les nouvelles combinaisons d'antibiotiques et d'antifongiques en utilisant un polymère hydrophile de poids moléculaire de 2000 g/mol. En combinant PEG-CHL, des CMI de 4 µg/ml ont été observés contre la bactérie *S. aureus*, tandis que la conjugaison PEG-Rifa a montré des CMI de 8 µg/ml contre *E. coli* à la fraction molaire 70/30. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les antibiotiques individuels, suggérant un effet bénéfique entre les deux molécules. Les résultats montrent que la CMI de la conjugaison PEG-Néo est plus élevée que celle de la Néo seule pour toutes les fractions molaires testées contre *E. coli* et *S. aureus*, suggérant un effet indifférent qui ne parvient pas à inhiber efficacement ces bactéries. Une situation similaire est observée avec *C. albicans*, ce qui est attribué à une incompatibilité avec le PEG2000. Cela indique que le PEG2000 a un effet sur les antimicrobiens, attribuable à leur mécanisme d'action. Il est souvent utilisé comme vecteur ou support pour les médicaments, y compris les antibiotiques afin d'améliorer leur solubilité dans les solutions aqueuses, ce qui facilite leur administration et leur répartition dans le corps (**Gref et al., 1994**). Grâce à leur stabilité et à leur biodisponibilité, les antibiotiques sont protégés contre la dégradation chimique ou enzymatique, ce qui prolonge leur durée d'action dans le corps (**Muzykantov, 2000**).

Pour mieux comprendre comment les molécules interagissent au niveau atomique, une simulation de dynamique moléculaire a été réalisée pour confirmer les résultats expérimentaux. Les données obtenues révèlent la nature et le nombre de liaisons hydrogène formées entre les molécules antimicrobiennes et le PEG2000, ce qui permet de juger de la fixation des molécules sur la chaîne du polymère. La force de la liaison hydrogène dépend de l'électronégativité des atomes et de l'énergie de la liaison, classée comme forte, modérée ou faible, avec une énergie variant respectivement de 40 à 15 kcal/mol.

Pour le Chloramphénicol et le PEG2000, les simulations montrent l'existence de deux liaisons hydrogène fortes. Plus précisément, la liaison O=NO...HCO avec une énergie de 40 kcal/mol est considérée comme modérément forte à forte, tandis que la liaison O=CN...HCO avec une énergie de 25 kcal/mol est modérée à forte. Cela indique une fixation efficace de deux

Résultats Discussion

molécules de Chloramphénicol sur la chaîne de PEG2000, confirmant un effet combiné efficace de cette combinaison sur *S. aureus*. En revanche, l'effet indifférent observé sur la souche *E. coli* peut être attribué au nombre insuffisant de molécules fixées sur la chaîne pour lutter efficacement contre cette espèce.

Pour la combinaison Néomycine et PEG2000, les calculs montrent la formation de huit liaisons hydrogène, avec dix molécules de Néomycine fixées par chaîne de PEG2000. Les types de liaisons identifiées incluent CCN...HCO (12 kcal/mol, faible à modérée), CO...HC (20 kcal/mol, modérée à forte), OH...OC (20 kcal/mol, modérée à forte), NCH...OC (15 kcal/mol, faible à modérée) et NH...OC (15 kcal/mol, faible à modérée). Malgré le nombre élevé de liaisons, ces énergies indiquent une fixation relativement modérée, ce qui peut expliquer l'absence d'un effet synergique observé *in vitro*.

La combinaison Rifamycine et PEG2000 révèle quatre liaisons hydrogène, avec sept molécules de Rifamycine fixées par chaîne de PEG2000. Les liaisons identifiées incluent HCO...HCH (20 kcal/mol, modérée à forte), NCO...HCH (20 kcal/mol, modérée à forte) et CH...OC (15 kcal/mol, faible à modérée). Ces résultats confirment expérimentalement un effet combiné bénéfique entre ces deux molécules, suggérant que les interactions hydrogène modérées à fortes contribuent à une efficacité antimicrobienne accrue de cette combinaison, notamment sur la souche *E. coli*.

Enfin, la combinaison Tioconazole et PEG2000 n'a démontré aucune liaison hydrogène avec le PEG2000 et aucune fixation de molécules par chaîne de PEG2000 n'a été observée. Cela confirme l'absence d'effet combiné entre le Tioconazole et le PEG2000, comme indiqué par les résultats *in vitro*, où aucune interaction synergique notable n'a été observée. Ces résultats soulignent l'importance des interactions moléculaires spécifiques dans la conception de formulations antimicrobiennes optimisées. Les liaisons hydrogène, en fonction de leur énergie, jouent un rôle crucial dans la fixation des molécules antimicrobiennes sur les chaînes de polymère, influençant ainsi leur efficacité

Conclusion

Conclusion

5 Conclusion

La résistance émergente aux antibiotiques et aux antifongiques représente un défi majeur dans le domaine de la santé publique à l'échelle mondiale. Ce phénomène, exacerbé par une utilisation prolifique et inadéquate de ces agents thérapeutiques, compromet la viabilité des traitements conventionnels et génère une instabilité dans la gestion des infections bactériennes et fongiques. Dans cette optique, la communauté scientifique a intensifié ses efforts de recherche pour identifier des solutions pérennes. Ces approches novatrices englobent la découverte de nouveaux agents antimicrobiens ainsi que l'adoption de politiques de prescription plus éclairées.

Dans le cadre de nos investigations, le choix du polyéthylène glycol (PEG) de masse molaire 2000 découle de son efficacité avérée en synergie avec les agents antimicrobiens. Nous avons procédé à son association avec plusieurs antibiotiques, notamment la Néomycine, la Rifampicine et le Chloramphénicol, ainsi qu'avec l'antifongique Tioconazole. Notre objectif primordial réside dans la conception de nouvelles formulations de PEG 2000 combinées à ces agents antimicrobiens, dans le dessein d'évaluer leur potentiel thérapeutique par le biais de tests *in vitro* ciblant *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*. Ces recherches visent à explorer de nouvelles stratégies de lutte contre les infections bactériennes et fongiques en exploitant les propriétés synergiques du PEG 2000 avec les antimicrobiens, ouvrant ainsi la voie à des avancées significatives dans le domaine de la thérapeutique antimicrobienne.

Dans l'optique d'approfondir notre compréhension des interactions physiques au niveau atomique entre ces combinaisons, nous avons initié une étude computationnelle. Cette étude repose sur l'utilisation de la dynamique moléculaire, un outil puissant permettant de simuler le mouvement des molécules dans des systèmes chimiques complexes. Nous avons spécifiquement utilisé le champ de force PCFF (Polymer Consistent Force Field), reconnu pour sa capacité à modéliser de manière précise les interactions entre les atomes constitutifs des polymères. Cette approche nous permet d'explorer en détail les structures et les dynamiques moléculaires des complexes formés par le polyéthylène glycol 2000 et les agents antimicrobiens, offrant ainsi des perspectives novatrices pour une meilleure conception et optimisation de ces formulations.

Nous avons observé une diversité remarquable dans le nombre de liaisons formées entre le Chloramphénicol et le PEG, ainsi qu'entre la Rifampicine et le PEG, souvent excédant trois liaisons. En contraste, entre la Néomycine et le PEG, ainsi qu'entre le Tioconazole et le PEG, une occurrence réduite, voire l'absence totale, de liaisons d'hydrogène a été observée. Ces

Conclusion

résultats soulignent de manière significative l'influence déterminante des interactions moléculaires spécifiques sur l'efficacité des formulations en question, mettant en lumière la nécessité d'une compréhension approfondie de ces phénomènes pour une conception optimale des agents thérapeutiques.

Notre recherche confirme que la collaboration entre Rifa-PEG et Chl-PEG engendre une synergie notable entre ces deux molécules, ce qui résulte en une efficacité augmentée, avec la proportion 70/30% de celle de l'antibiotique en monothérapie. Les simulations de dynamique moléculaire ont permis de visualiser de manière détaillée les interactions atomiques, y compris les liaisons hydrogène. Ces interactions moléculaires spécifiques contribuent significativement à renforcer l'efficacité de la nouvelle entité moléculaire contre les souches microbiennes étudiées. Ces constats soulignent l'importance capitale des interactions moléculaires dans la conception optimale des formulations antimicrobiennes, offrant ainsi des perspectives prometteuses pour le développement de thérapies plus efficaces contre les infections.

Cependant, l'association entre Neo-PEG et Tio-PEG n'a pas révélé de synergie, ce qui indique que chaque molécule agit de manière autonome, sans interaction significative entre elles. Ce résultat constitue une avancée significative et ouvre de nouvelles perspectives pour la conception de conjugués prometteurs, visant à combattre une variété de souches pathogènes. En développant des médicaments antibactériens plus efficaces, cette approche cherche à réduire la toxicité et les effets indésirables associés à ces traitements. Ces découvertes soulignent l'importance cruciale des interactions moléculaires spécifiques impliquant à la fois les antifongiques, les antibiotiques et les polymères. Cette démarche vise à élaborer des stratégies plus performantes dans la lutte contre ces infections, en se concentrant sur le développement de thérapies ciblées et de traitements antimicrobiens mieux adaptés.

Références bibliographiques

6 Références Bibliographiques

- Alhussaini, M. S. (2013). Phenotypic and Molecular Characterization of Candida Species in Urine Samples from Renal Failure Patients. *Science Journal of Clinical Medicine*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.11648/j.sjcm.20130201.13>
- Bianchi, V., El Anbassi, S., & Duployez, N. (2013). *Bactériologie virologie*. De Boeck, 127.
- Biyiti, L. F., Meko, D. J. L., & Zollo, P. H. A. (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises. *Pharmacologie et Médecine Traditionnelle en Afrique*, 13, 11-20.
- Bourgeois, A. (1999). Les MST/SIDA au Cameroun. *Biodiagnostic and Therapy, Magazine Bilingue de Santé au Cameroun*, n°004.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Erum, H., & Shafaq, A. H. (2019). Evaluation of antibiotic resistance pattern in clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4), 1749-1753.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., & Langer, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263(5153), 1600-1603. <https://doi.org/10.1126/science.8128245>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Abley, H. L. M. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- Lakhdar, L., Farah, A., Lahlou, I., Rida, S., Bouziane, A., & Ennibi, O. (2017). Antibacterial effectiveness of selected Moroccan essential oils against the highly virulent Jp2 clone of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 47. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i2.13406>
- Mendoza-Juache, A., Aranda-Romo, S., Bermeo-Escalona, J. R., Gómez-Hernández, A., Pozos-Guillén, A., & Sánchez-Vargas, L. O. (2017). The essential oil of Allium sativum as an alternative agent against Candida isolated from dental prostheses. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(3), 158–164.

Références Bibliographiques

- Marcel, J. P. (2005). L'antibiogramme et son impact médical. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(1), 53-58. [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(05\)80166-9](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(05)80166-9)
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Melvin, P. W., & James, S. L. (2020). The Clinical and Laboratory Standards Institute Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Background, Organization, Functions, and Processes. <https://doi.org/10.1128/jcm.01864-19>
- Muzykantov, V. R. (2000). Drug delivery by red blood cells: Vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(7), 813-834. <https://doi.org/10.1517/17425241003610633>
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 58. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Pulcini, C., Naqvi, A., Gardella, F., Dellamonica, P., & Sotto, A. (2010). Résistance bactérienne et prescription antibiotique : perceptions, attitudes et connaissances d'un échantillon de médecins généralistes. *Médecine et maladies infectieuses*, 40(12), 703-709. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2010.09.018>
- Rosco. (2011). Susceptibility Testing of Yeasts 2011: Agar Diffusion Method. *Rosco Diagnostica*, 2-5.
- Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., & Kunkel, D. (2015). Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida* sp. Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.003>
- Thabaut, A., & Durosoir, J. L. (1979). L'Antibiogramme : Méthodes classiques et Méthodes automatisées. *Annales de Biologie Clinique*, 9(9), 490-495. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(79\)80006-2](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(79)80006-2)
- Thomson, A. B. (1997). A suggested approach to patients with dyspepsia. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 11(2), 135-140. <https://doi.org/10.1155/1997/273103>
- Whithear, K. G., Htwe, T., & Sulaiman, L. (1986). Survey of disc diffusion antimicrobial sensitivity testing in avian bacteriology laboratories and the evaluation of a standardised method. *Australian Veterinary Journal*, 63(4), 134-137. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb07677.x>

Les Annexes

Annexes

7 Les Annexes

Annexe1: Equipement de laboratoire

			
Incubateur	Bain marie	Agitateur	Vortex
			
Microscope	Autoclave	Spectrophotometre	Balance magnétique

Annexes

Annexe2: Produits utilisés

		
Néomycine	Rifamycine	DMSO
		
Tioconazole	Gélose sabouraud	BHI

Annexes

Annexes 3: compositions des milieux de culture.

Milieu de culture	Compositions
Mc Conckey	Tryptone pancréatique de gélatine.....17,0g Tryptone.....150g Peptonepepsique de viande.....150g Lactose.....10,0g Sels biliaires.....1,5g Chlorure de sodium.....5,0g Rouge neutre.....30mg Cristal violet.....1,0mg Agar.....13,5g
Chapman	Peptone.....11g. extrait de bœuf.....1 g. chlorure de sodium.....75 g. D-mannitol.....10 g. rouge de phénol.....25 mg. Agar.....15 g.
Gélose nutritive	Tryptone.....5,0g Extrait de viande.....1,0g Extrait de levure.....2,0g Chlorure de sodium.....5,0g Agar.....12,0g
Gélose Muller-Hinton	Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17,5 g

Annexes

	Extrait de viande.....2,0 g Amidon.....1,5 g Calcium.....20 à 25 mg Magnésium.....10 à 12,5 mg Agar.....15,0 g Eau distillée.....qsp 1 L Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17,5 g Extrait de viande.....2,0 g
Milieu Yeast Peptone dextrose	Peptone.....20g Glucose (dextrose).....20g Extrait de levure.....10g L'eau distillée stérile.....1000ml
Milieu Sabouraud	Peptone.....10 g Glucose.....40 g Agar agar.....15 g Actidione.....0.5 g Chloramphenicol.....0.5 g L'eau distillée stérile.....1000 ml

Annexes



Annexe 4: Le test d'antibiogramme qui a été réalisé au laboratoire.



Annexe 5 : Test de microdilution sur microplaques.

Annexes

Annexe 7 : protocoles expérimentaux

Protocol expérimental de la conjugaison (Tioconazole-PEG2000)

On va commencer par la concentration initiale $C_p = 1 \text{ mg/ml}$.

On a:

$$\frac{m_A + m_B}{V} = 1 \text{ mg/ml} \Rightarrow m_A + m_B = 1 \times V$$

Tel que m_{AC} 'est la masse de l'antibiotique (Tioconazole dans notre cas) en mg

M_{BC} 'est la masse du PEG-2000 en mg

Pour réaliser un volume de 5 ml de la solution finale notre équation devient alors :

$$m_A + m_B = 1 \times 5 = 5 \text{ mg} \rightarrow (1)$$

Maintenant par définition de la fraction molaire :

$$X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B} \Rightarrow n_A = X_A(n_A + n_B)$$

n_A : le nombre de moles de l'ATB (moles).

n_B : le nombre de moles PEG-2000 (moles).

$$n_A - (X_A \times n_A) = X_A \times n_B$$

$$n_B = \frac{n_A - (X_A \times n_A)}{X_A} = n_A \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Maintenant passons des nombres de moles vers les masses :

Soit notre antifongique est le Tioconazole de masse molaire : $M_A = 387,7 \text{ g/mol}$

Pour le PEG sa masse molaire : $M_B = 2000 \text{ g/mol}$.

$$\frac{m_B}{M_B} = \frac{m_A}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right) \Rightarrow m_B = m_A \times \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

$$\text{On définit } W = \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Ce qui revient à dire $m_A = m_B \times W$

Revenant maintenant à notre équation (1) :

$$m_A + m_A \times W = 5 \Rightarrow m_A(1 + W) = 5$$

$$m_A = \frac{5}{1 + W}$$

$$\text{Donc en fin : } \begin{cases} m_A = \frac{5}{1+W} \\ m_B = 5 - m_A \end{cases}$$

Annexes

Protocole expérimental de la conjugaison (Chloramphénicol-PEG2000)

On va commencer par la concentration initiale $C_P = 1 \text{ mg/ml}$.

On a:

$$\frac{m_A + m_B}{V} = 1 \text{ mg/ml} \Rightarrow m_A + m_B = 1 \times V$$

Tel que m_A est la masse de l'antibiotique (Chloramphenicol dans notre cas) en mg

m_B est la masse du PEG-2000 en mg

Pour réaliser un volume de 5 ml de la solution finale notre équation devient alors :

$$m_A + m_B = 1 \times 5 = 5 \text{ mg} \rightarrow (1)$$

Maintenant par définition de la fraction molaire :

$$X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B} \Rightarrow n_A = X_A(n_A + n_B)$$

n_A : le nombre de moles de l'ATB (moles).

n_B : le nombre de moles PEG-2000 (moles).

$$n_A - (X_A \times n_A) = X_A \times n_B$$

$$n_B = \frac{n_A - (X_A \times n_A)}{X_A} = n_A \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Maintenant passons des nombres de moles vers les masses :

Soit notre antifongique est le Chloramphénicol de masse molaire : $M_A = 323,13 \text{ g/mol}$

Pour le PEG sa masse molaire : $M_B = 2000 \text{ g/mol}$.

$$\frac{m_B}{M_B} = \frac{m_A}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right) \Rightarrow m_B = m_A \times \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

$$\text{On définit } W = \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Ce qui revient à dire $m_B = m_A \times W$

Revenant maintenant à notre équation (1) :

$$m_A + m_A \times W = 5 \Rightarrow m_A(1 + W) = 5$$

$$m_A = \frac{5}{1 + W}$$

$$\text{Donc en fin : } \begin{cases} m_A = \frac{5}{1+W} \\ m_B = 5 - m_A \end{cases}$$

Annexes

Protocole expérimental de la conjugaison (Rifamycine SV sodium salt PEG2000) :

On va commencer par la concentration initiale $C_p = 1 \text{ mg/ml}$.

On a :

$$\frac{m_A + m_B}{V} = 1 \text{ mg/ml} \Rightarrow m_A + m_B = 1 \times V$$

Tel que m_A est la masse de l'antibiotique (Rifamycine SV sodium salt dans notre cas) en mg
 m_B est la masse du PEG-2000 en mg

Pour réaliser un volume de 5 ml de la solution finale notre équation devient alors :

$$m_A + m_B = 1 \times 5 = 5 \text{ mg} \rightarrow (1)$$

Maintenant par définition de la fraction molaire :

$$X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B} \Rightarrow n_A = X_A(n_A + n_B)$$

n_A : le nombre de moles de l'ATB (moles).

n_B : le nombre de moles PEG-2000 (moles).

$$n_A - (X_A \times n_A) = X_A \times n_B$$

$$n_B = \frac{n_A - (X_A \times n_A)}{X_A} = n_A \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Maintenant passons des nombres de moles vers les masses :

Soit notre antifongique est le Rifamycine SV sodium salt de masse molaire : $M_A = 720,8 \text{ g/mol}$

Pour le PEG sa masse molaire : $M_B = 2000 \text{ g/mol}$

$$\frac{m_B}{M_B} = \frac{m_A}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right) \Rightarrow m_B = m_A \times \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

$$\text{On définit } W = \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Ce qui revient à dire $m_A = m_B \times W$

Revenant maintenant à notre équation (1) :

$$m_A + m_A \times W = 5 \Rightarrow m_A(1 + W) = 5$$

$$m_A = \frac{5}{1 + W}$$

$$\text{Donc en fin : } \begin{cases} m_A = \frac{5}{1+W} \\ m_B = 5 - m_A \end{cases}$$

Annexes

Protocole expérimental de la conjugaison (Néomycine (sulfate)-PEG2000) :

On va commencer par la concentration initiale $C_p = 1 \text{ mg/ml}$.

On a:

$$\frac{m_A + m_B}{V} = 1 \text{ mg/ml} \Rightarrow m_A + m_B = 1 \times V$$

Tel que m_A c'est la masse de l'antibiotique (Néomycine (sulfate) dans notre cas) en mg
 m_B c'est la masse du PEG-2000 en mg

Pour réaliser un volume de 5 ml de la solution finale notre équation devient alors :

$$m_A + m_B = 1 \times 5 = 5 \text{ mg} \rightarrow (1)$$

Maintenant par définition de la fraction molaire :

$$X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B} \Rightarrow n_A = X_A(n_A + n_B)$$

n_A : le nombre de moles de l'ATB (moles).

n_B : le nombre de moles PEG-2000 (moles)

$$n_A - (X_A \times n_A) = X_A \times n_B$$

$$n_B = \frac{n_A - (X_A \times n_A)}{X_A} = n_A \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Maintenant passons des nombres de moles vers les masses :

Soit notre antifongique est le Neomycin (sulfate) de masse molaire : $M_A = 630,76 \text{ g/mol}$

Pour le PEG sa masse molaire : $M_B = 2000 \text{ g/mol}$.

$$\frac{m_B}{M_B} = \frac{m_A}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right) \Rightarrow m_B = m_A \times \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

$$\text{On définit } W = \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Ce qui revient à dire $m_B = m_A \times W$

Revenant maintenant à notre équation (1) :

$$m_A + m_A \times W = 5 \Rightarrow m_A(1 + W) = 5$$

$$m_A = \frac{5}{1 + W}$$

$$\text{Donc en fin : } \begin{cases} m_A = \frac{5}{1+W} \\ m_B = 5 - m_A \end{cases}$$