

Université Ibn Khaldoun, Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

en

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.
Filière : Sciences Biologiques.
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présenté par :

BENHOCINE Youcef

Intitulé

Evaluation des risques écotoxicologiques et sanitaires des eaux dans la région de Tiaret, Algérie

Soutenu le 12 Octobre 2020 à 10h00

Devant les membres de jury :

Président	Dr. ALI NEHARI AEK	MCA
Examineur	Dr. BOUSSAID M.	MCA
Encadrant	Dr. TAIBI K.	MCA
Invité	M. GUENDOUZ A. Ing. Directeur du barrage Benkheda (Tiaret)	

Année universitaire 2019-2020

Résumé

Les eaux polluées constituent non seulement une véritable menace aux consommateurs surtout à l'échelle cellulaire et moléculaire mais elles peuvent être aussi vecteurs de plusieurs éléments xénobiotiques pouvant être responsables d'autres complications sanitaires notamment l'émergence de l'antibiorésistance bactérienne.

Le présent travail consiste d'abord en une évaluation des effets cytotoxique et génotoxique qui peuvent être induits suite à la consommation de l'eau polluée dans la ville de Tiaret en utilisant le test d'*Allium cepa*. Ensuite, l'approche de modélisation biologique *via* l'étude *in silico* est utilisée pour chercher des molécules actives issues de produits naturels pouvant constituer de potentiels inhibiteurs des enzymes 'New Delhi Metallo- β -lactamases (NDM-1)' responsables de l'antibiorésistance bactérienne.

Les résultats obtenus confirment l'efficacité du test d'*Allium cepa* comme outil de diagnostic simple et pratique pour la surveillance de la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. En revanche, l'étude *in silico* a pu mettre en évidence la faisabilité de la recherche et d'emploi des molécules actives d'origine naturelle pour contrebalancer l'antibiorésistance bactérienne. Il s'est avéré que la pipéracilline est l'antibiotique bêta-lactamine qui présente une affinité de liaison maximale à la New Delhi Métallo-bêta-lactamase 1 (NDM-1) par rapport aux autres neuf antibiotiques reconnus. Cependant, parmi les dix biomolécules naturelles testées qui pourraient exercer une potentielle inhibition de l'enzyme NDM-1, la catéchine-afzelechine, la withaférine A, la diosgénine, la e-guggulstérone, la digallate de théaflavine et l'acide aristolochique ont présenté de meilleures affinités avec le site actif de NDM-1 par rapport à l'antibiotique de référence la pipéracilline.

Les molécules actives identifiées dans la présente étude ont montré des résultats *in silico* très intéressants comme de potentiels inhibiteurs de la NDM-1 et par conséquent de l'antibiorésistance. Il est donc envisagé que les inhibiteurs identifiés serviront de meilleur point de départ pour les études expérimentales visant la conception et la découverte des inhibiteurs de NDM-1. De plus, des expériences *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires afin de confirmer le potentiel inhibiteur de ces molécules afin de les promouvoir comme agents antibactériens.

Mots clés

Eau, pollution, test *Allium cepa*, cytotoxicité, génotoxicité, modélisation biologique, *in silico*, β -lactamase, β -lactamines, produits naturels.

Abstract

In addition to posing a real threat to consumers, especially at the cellular and molecular level, polluted water can also be a vector for several xenobiotic elements that can be responsible for other health complications, particularly the rise of bacterial antibiotic resistance.

The present work involves first an evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects that can be induced as a consequence of the intake of contaminated water in the town of Tiaret using the *Allium cepa* test. Afterwards, the biological modeling approach through *in silico* study is used to search active molecules from natural products that may constitute potential inhibitors of 'New Delhi Metallo- β -lactamases (NDM-1)' enzymes responsible for bacterial antibiotic resistance.

The obtained results validate the effectiveness of the *Allium cepa* test as a simple and practical diagnostic tool for the monitoring of water quality intended for human use. On the other hand, the *in silico* study highlighted the feasibility of finding and use of active molecules from natural origin to overwhelmed bacterial antibiotic resistance. Piperacillin was found to be the beta-lactam antibiotic with the highest binding affinity to New Delhi Metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1) compared to the other nine recognized antibiotics. However, among the ten naturally occurring biomolecules tested that could potentially inhibit the NDM-1 enzyme, catechin-afzelechine, withaferin A, diosgenin, e-guggulsterone, theaflavin digallate and aristolochic acid showed higher affinities to the active site of NDM-1 compared to the control antibiotic piperacillin.

The active molecules identified in the present study showed very promising *in silico* data as potential inhibitors of NDM-1 and thereby of antibiotic resistance. It is expected that the identified inhibitors will serve as the best starting point for experimental studies targeting the design and discovery of NDM-1 inhibitors. In addition, *in vitro* and *in vivo* experiments are required to confirm the inhibitory potential of these molecules in order to promote them as antibacterial agents.

Keywords

Water, pollution, *Allium cepa* test, cytotoxicity, genotoxicity, biological modelling, *in silico*, β -lactamase, β -lactam, natural products.

الملخص

بالإضافة إلى أنها تشكل تهديدًا حقيقيًا للمستهلكين، لا سيما على المستوى الخلوي والجزيئي، يمكن أن تكون المياه الملوثة أيضًا ناقلًا للعديد من العناصر الغريبة الحيوية التي يمكن أن تكون مسؤولة عن مضاعفات صحية أخرى، خاصة ارتفاع مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية.

يتضمن العمل الحالي أولاً تقييم التأثيرات السامة على الخلايا والجينات التي يمكن أن تحدث نتيجة تناول المياه الملوثة في منطقة تيارت باستخدام اختبار البصل. بعد ذلك، يتم استخدام نهج النمذجة البيولوجية للتحقيق في الجزيئات النشطة من المنتجات الطبيعية التي قد تشكل مثبطات محتملة لإنزيمات 'New Delhi Metallo- β -lactamases (NDM-1)' المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية البكتيرية.

النتائج التي تم الحصول عليها تثبت فعالية اختبار البصل كأداة تشخيصية بسيطة وعملية لمراقبة جودة المياه المخصصة للاستخدام البشري. من ناحية أخرى، سلطت الدراسة في السيليكو الضوء على جدوى إيجاد واستخدام جزيئات نشطة ذات أصل طبيعي للتغلب على مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية. تم العثور على بيبيراسيلين ليكون المضاد الحيوي بيتا لاكتام مع أعلى تقارب ارتباط مع New Delhi Metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) مقارنة بالمضادات الحيوية التسعة الأخرى المعترف بها. ومع ذلك، من بين الجزيئات الحيوية العشرة التي تم اختبارها بشكل طبيعي والتي يمكن أن تمنع إنزيم NDM-1، أظهر كاتشين أفزيليكين، ويثافيرين أ، ديوسجينين، إي غوغولسترون، ثيافلافين ديجالات وحمض أرسنولوكيك تقاربًا أعلى مع الموقع النشط لـ NDM-1 مقارنة بـ بيبيراسيلين المضاد الحيوي.

أظهرت الجزيئات النشطة التي تم تحديدها في هذه الدراسة نتائج واعدة جدًا في بيانات السيليكو كمثبطات محتملة لـ NDM-1 وبالتالي مقاومة للمضادات الحيوية. من المتوقع أن تكون المثبطات التي تم تحديدها بمثابة أفضل نقطة انطلاق للدراسات التجريبية التي تستهدف تصميم واكتشاف مثبطات NDM-1. بالإضافة إلى ذلك، يلزم إجراء تجارب في المختبر وفي الجسم الحي لتأكيد القدرة التثبيطية لهذه الجزيئات من أجل تعزيزها كعوامل مضادة للبكتيريا.

الكلمات الدالة

الماء، التلوث، اختبار البصل، السمية الخلوية، السمية الجينية، النمذجة البيولوجية، السيليكو، بيتا لاكتاماز، بيتا لاكتام، المنتجات الطبيعية.

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je remercie dieu le tout puissant de m'avoir accordé le courage et la volonté de venir à bout de mon cursus universitaire jusqu'à présent.

Toute ma gratitude s'adresse à Monsieur Khaled TAÏBI, qui s'est montré comme source d'inspiration irrévocable et mentor pendant ces deux dernières années. Son dévouement à la recherche scientifique et l'acharnement à si bien faire pour l'université est un exemple à suivre et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu la lumière du jour.

Je profite de l'occasion pour exprimer ma reconnaissance à Mesdames Leila AÏT ABDERRAHIM et Nacera MEDJEBER dont leurs gentillesse et présence à mes côtés furent d'un agréable bien-être.

Je remercie également les membres de jury, M. ALI NEHARI AEK et M. BOUSSAID M. ainsi que l'invité d'honneur M. GUENDOZ A. le Directeur du Barrage Benkheda (Tiaret) d'avoir agréé à accorder leur bienveillante attention à l'évaluation de cet humble travail.

Je tiens aussi à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur Mohamed SASSI, doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, ainsi qu'à toute l'équipe de Biologie Moléculaire et Cellulaire pour leur engagement remarquable à transmettre des idées de première importance.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Liste des figures

Figure 1. Fenêtre de visualisation AutoDock Tools	15
Figure 2. Fenêtre de visualisation Discovery Studio Visualizer	16
Figure 3. Interface graphique de Chimera	16
Figure 4. Interface du site web PDB	17
Figure 5. Interface du site web PubChem	18
Figure 6. Interface du site web NPASS	18
Figure 7. Cellules micronucléés (1 et 2)	25
Figure 8. Anaphase avec pont chromosomique	25
Figure 9. Superposition de la méthicilline simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (rouge). RMSD 1.7 Å. Image générée par Discovery Studio	26
Figure 10. Superposition de l'ampicilline simulé par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (rouge). RMSD 1.2 Å	27
Figure 11. Superposition de l'inhibiteur NO9 simulé par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina. RMSD 0.4 Å	27
Figure 12. Mode de liaison de la NDM-1 avec la pipéracilline amarrée. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : pipéracilline. Image générée par Discovery Studio Visualizer	29
Figure 13. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la pipéracilline. Les résidus en vert et en vert clair impliquent les liaisons hydrogènes et de van der Waals respectivement. Le résidu en orange montre la liaison de soufre	29
Figure 14. Emplacement de la pipéracilline dans le site catalytique de la bêta-lactamase. Image générée par Discovery Studio Visualizer	30
Figure 15. Mode de liaison de la NDM-1 avec la catéchine-afzelechine. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : catéchine-afzelechine	31
Figure 16. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la catéchine-afzelechine. Les résidus en vert impliquent les liaisons hydrogènes, en jaune la liaison de soufre, en rose et en violet des liaisons hydrophobiques, en orange une liaison électrostatique et en rouge une liaison non-favorable	31
Figure 17. Emplacement de la catéchine-afzelechine dans le site catalytique de la bêta-lactamase	32
Figure 18. Mode de liaison de la NDM-1 avec la diosgénine. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : diosgénine	32

Figure 19. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la diosgénine A. Les résidus en violet et en rose impliquent des liaisons hydrophobiques. Le résidu en vert implique une liaison hydrogène et ceux en vert clair des interactions de van der Waals	33
Figure 20. Emplacement de la diosgénine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.....	33
Figure 21. Mode de liaison de la NDM-1 avec la withaférine A. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : withaférine A.....	34
Figure 22. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la withaférine A. Les résidus en violet et en rose impliquent des liaisons hydrophobiques.....	34
Figure 23. Emplacement de la withaférine A dans le site catalytique de la bêta-lactamase	35
Figure 24. Mode de liaison de la NDM-1 avec la e-guggulstérone. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : e-guggulstérone	35
Figure 25. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la e-guggulstérone. Le résidu en violet implique une liaison hydrophobique	36
Figure 26. Emplacement de la e-guggulstérone dans le site catalytique de la bêta-lactamase	36
Figure 27. Mode de liaison de la NDM-1 avec la digallate de théaflavine. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : digallate de théaflavine.....	37
Figure 28. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la digallate de théaflavine. Les résidus en violet impliquent des liaisons hydrophobiques, en vert des liaisons hydrogènes et en orange des liaisons électrostatiques	37
Figure 29. Emplacement de la digallate de théaflavine dans le site actif de la bêta-lactamase	38
Figure 30. Mode de liaison de la NDM-1 avec l'acide aristolochique. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : acide aristolochique.....	39
Figure 31. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et l'acide aristolochique. Les résidus en violet et rose impliquent des liaisons hydrophobiques, en vert et vert clair des liaisons hydrogènes et en orange des liaisons électrostatiques.....	39
Figure 32. Emplacement de l'acide aristolochique dans le site actif de la bêta-lactamase.....	40

Liste des Tableaux

Tableau 1. Les effets toxicologiques de certains métaux lourds et métalloïdes.....	3
Tableau 2. Valeur des lignes directrices de l’OMS pour certains éléments.....	4
Tableau 3. Caractéristiques des NDM-1 sélectionnées	19
Tableau 4. Représentation des structures 2D et les formules des antibiotiques testés.....	20
Tableau 5. Représentation des structures 2D et les formules des produits naturels testés.....	21
Tableau 6. Valeurs de RMSD des trois complexes NDM-1 étudiés	26
Tableau 7. Energie moyenne de liaison des antibiotiques et de l’inhibiteur avec la NDM-1 utilisée dans l’étude de docking	28
Tableau 8. Energie moyenne de liaison des différents produits naturels enregistrée avec la NDM-1 par AutoDock Vina en opposition à la pipéracilline	30
Tableau 9. Tableau récapitulatif des diverses interactions de la New Delhi Métallo- β -lactamase avec l’antibiotique de référence et les composés naturels choisis.....	40

Liste des abréviations

2D : Deux Dimensions

3D: Trois Dimensions

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADT: AutoDock Tools

ALA : Alanine

ARN : Acide Ribonucléique

ASN : Asparagine

ASP : Acide Aspartique

BRA : Bactéries Résistantes aux Antibiotiques

CA : Chromosomal Aberrations

CPU: Central Processing Unit

CYS : Cystéine

GLN : Glutamine

GLU : Acide Glutamique

GLY : Glycine

GRA : Gènes de Résistance aux Antibiotiques

H₂O : Eau

HCL : Acide chlorhydrique

HD: Haute Définition

HIS : Histidine

ID : Identifiant

ILE: Isoleucine

KDa: Kilodalton

Kcal/mol: Kilocalorie per mole

LEU : Leucine

LYS : Lysine

MBL : Métallo-Bêta-Lactamase

MET : Méthionine

MN : Micronoyaux

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NDM-1 : New Delhi Métallo-bêta-lactamase-1

NPASS: Natural Product Activity and Species Source database

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PDB : Protein Data Bank

PHE : Phénylalanine

PN : Produits Naturels

PRO : Proline

RAM: Random Access Memory

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD: Root Mean Square Deviation

SBL : Sérine-Bêta-Lactamase

SDM : Simulation de la Dynamique Moléculaire

SER : Sérine

THR : Thréonine

TRP : Tryptophane

VAL : Valine

Table des matières

Résumé	
Abstract	
.....الملخص	
-Liste des figures	
-Liste des tableaux	
-Liste des abréviations	
-Table des matières	

Etat de l'art

1. Vue d'ensemble	1
2. Objectif	11

Matériel et méthodes

1. Etude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité et la génotoxicité	12
1.1. Matériel	12
1.2. Test <i>Allium cepa</i>	12
1.3. Observation microscopique	13
2. Etude <i>in silico</i> pour la recherche des inhibiteurs des enzymes bêta-lactamases	13
2.1. Matériel	14
2.1.1. Microordinateur	14
2.1.2. Software	14
a. AutoDock Vina	14
b. Discovery Studio Visualizer	15
c. UCSF Chimera	16
2.1.3. Banques de données	17
a. La banque de données protéiques, <i>Protein Data Bank</i> (PDB)	17
b. PubChem	17
c. NPASS	18

2.2. Méthodes	19
2.2.1. Choix du récepteur	19
2.2.2. Choix des antibiotiques et des composés naturels inhibiteurs.....	20
2.2.3. Protocole du docking moléculaire	23
a. Préparation du récepteur et des ligands	23
b. Exécution de AutoDock Vina	23
c. Validation du docking moléculaire	24

Résultats

1. Etude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité et la génotoxicité	25
2. Etude <i>in silico</i> des inhibiteurs de β -lactamases	26
2.1. Validation du protocole de docking moléculaire	26
a. Test RMSD	26
b. Analyse visuelle	26
2.2. Docking des différentes molécules sur le récepteur NDM-1 (5ZGE)	27
a. Identification de l'antibiotique qui se lie avec précision avec NDM-1 (5ZGE)	27
b. Nature de interactions du complexe 'NDM-1 : pipéracilline'	28
c. Amarrage des produits naturels à la NDM-1	30
d. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : catéchine-afzelechine'	31
e. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : diosgénine'	32
f. Nature de interactions du complexe 'NDM-1 : withaférine A'	33
g. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : e-guggulstérone'	35
h. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : digallate de théaflavine'	36
i. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : acide aristolochique'	38
 Discussion	 41
 Conclusion et perspectives	 46
 Références bibliographiques	 48

Etat de l'art

Etat de l'art

1. Vue d'ensemble

La pollution de l'environnement a suscité de nombreuses préoccupations ces dernières années et devient un problème de plus en plus grave. Cependant, l'influence des facteurs environnementaux sur la santé et le bien-être humain demeure encore superficiellement élucidée (Li et Zhou, 2020).

En outre, la raréfaction et la dégradation sans cesse accrue de la qualité des ressources hydriques et des écosystèmes aquatiques ont pris, au cours des dernières décennies, une ampleur catastrophique et constituent une des dimensions environnementales les plus préoccupantes du 21^{ème} siècle. Toutefois, la détérioration de la qualité des ressources hydriques est fortement liée, non seulement aux pathogènes biologiques, mais également aux produits chimiques fabriqués par l'homme (rejets usés inconsidérés des agglomérations, déchets solides, activités agricoles, industriels et minières). Leur présence dans l'environnement est responsable des cas de pollution des plus importants et récurrents rendant très difficile voire impossible la préservation de la qualité de ces écosystèmes (Zgheib, 2009).

Ainsi, l'approvisionnement en eau douce devient difficile tant en raison du développement accéléré des techniques industrielles modernes que de l'accroissement de la population et l'amélioration de son niveau de vie (Chaden, 2014). De ce fait, les besoins considérables de la civilisation moderne ont exercé une pression importante sur le mode d'exploitation des ressources hydriques à travers une utilisation plus accrue des eaux de surface au lieu de l'emploi des eaux de sources et de nappes. Selon les données officielles de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 80 % des maladies humaines dans le monde sont liées à la consommation d'eau potable de mauvaise qualité.

Environ de 75 à 90 % de la population mondiale utilise une eau d'origine souterraine. Les eaux souterraines artésiennes sont une source d'eau potable qui est protégée de manière fiable contre les impacts humains et elles représentent environ 97 % du total des eaux douces continentales liquides (Benadela et Bekkoussa, 2017). Des études ont révélé que la dégradation des ressources hydriques souterraines provient notamment de l'infiltration des eaux usées et l'utilisation des engrais chimiques en agriculture, de la présence des fosses septiques, du manque du réseau d'assainissement et du non-respect des conditions d'hygiène publique (Ayad, 2017).

L'Algérie souffre d'une grave pénurie d'eau et elle est classée au quatorzième rang mondial des pays les plus pauvres en ressources hydriques. Dans le même temps, l'Algérie a enregistré un taux de croissance démographique élevé (1,98 %). En d'autres termes, il existe un déséquilibre

dramatique entre la disponibilité et la demande en eau, malgré une réserve de 17 milliards m³ d'eau (10 milliards m³ d'eau de surface et 7 milliards m³ d'eau souterraine). Pour couvrir le déficit perçu en matière de disponibilité de l'eau, les autorités algériennes ont lancé une nouvelle stratégie nationale visant à explorer des sources d'eau non conventionnelles telles que le dessalement de l'eau de mer et le traitement des eaux usées, en plus d'un programme ambitieux de construction de nouveaux barrages et de mobilisation des ressources en eau dans les zones touchées par des pénuries d'eau par le biais de grands projets de transfert et de systèmes interconnectés (Soltani et al., 2020).

Cependant, la nature globale des activités humaines au 20^{ème} siècle a entraîné une pollution et une contamination à grande échelle des eaux de surface. Les eaux douces de surface sont la deuxième source d'eau potable la plus courante de l'approvisionnement en eau. Les substances chimiques présentes dans les eaux douces ne peuvent pas être facilement neutralisées en raison de leur structure complexe. De plus, elles ont un grand potentiel pour rester intactes dans n'importe quel type d'environnement.

La plupart de ces substances s'accumulent dans les sédiments de fond et seulement une concentration très minime sous forme de constituants organiques et inorganiques qui restent soit en suspension, soit en solution dans le milieu liquide, et la présence de ce type de polluants a des effets à long terme sur les biotes aquatiques et associés (Qadri et al., 2020).

Dans le mode de vie contemporain, les produits pharmaceutiques sont de plus en plus et inévitablement consommés. Cependant, des quantités considérables de ces produits sont libérées dans la nature et sont responsables de la pollution aquatique, notamment de la pollution des rivières, des sources d'eau potable et des lacs.

La propagation rapide et importante de la pollution d'origine pharmaceutique est devenue une menace réelle et suscite un intérêt considérable dans le monde entier. Les hôpitaux constituent le principal lieu où ces produits sont systématiquement utilisés pour traiter les maladies. Les eaux usées des hôpitaux contiennent de grandes quantités d'organismes pathogènes, de substances dangereuses et persistantes telles que des produits pharmaceutiques, des radionucléides, des solvants, des désinfectants et des métaux. En effet, les effluents hospitaliers peuvent rejeter une quantité importante de polluants présentant des risques tératogènes, cancérigènes et mutagènes (Beltifa et al., 2019).

Chaque jour, des millions de tonnes d'eaux usées et de déchets industriels et agricoles sont rejetés dans les eaux de la planète, tandis que la quantité d'eaux usées produites chaque année est estimée à environ $1,5 \times 10^3$ km³, soit 06 fois plus d'eau que dans tous les fleuves du monde (Qadri et al., 2020).

La dégradation de la qualité des eaux se répercute sur la santé de l'homme et de l'environnement notamment à travers l'irrigation des champs de cultures agricoles par des eaux non traitées et/ou polluées ce qui peut mener à l'obtention d'aliments contaminés. Les produits chimiques agricoles, en particulier les pesticides, constituent aussi une source d'infection des aliments. De même, les métaux rejetés dans l'environnement entrent aussi en lice comme principaux agents d'infection de la nourriture à travers l'utilisation des boues d'épuration polluées comme engrais des terres agricoles. Les sels métalliques formés au cours des processus de récupération et de raffinage peuvent s'échapper sous forme de déchets dans les eaux de surface et souterraines (Dugan, 1972).

Dans l'ensemble, les polluants, que ce soit de nature chimique organique et inorganique, peuvent être des composés bactéricides et viraux, des substances radioactives d'origine naturelle ou anthropique, des composés mutagènes et des composés mycosiques (Goncharuk, 2014).

Les polluants inorganiques comprennent de nombreux acides minéraux, des métaux, des cyanures, des complexes métalliques, des complexes métalliques organiques, etc. qui ne peuvent pas être éliminés facilement de l'environnement. L'accumulation de métaux lourds et des ions ont un effet négatif sur la vie aquatique du système terrestre et sont à l'origine de divers problèmes de santé notamment sur le foie, les reins, le système nerveux, le système circulatoire, le sang, le système gastro-intestinal, les os et la peau (Tableau 1).

Tableau 1. Les effets toxicologiques de certains métaux lourds et métalloïdes (Peralta-Videa et al., 2009).

Métaux	Source	Forme d'existence	Effets sur les plantes	Effets sur les animaux
Arsenic	Erosion des roches, exploitation minière	Inorganique et méthylée	Stress oxydatif, troubles physiologiques	Cancer de la peau, troubles respiratoires
Cadmium	Raffineries, engrais	Phosphates marins	Germination réduite des graines	Cancer de la prostate, atrophie testiculaire
Chrome	Peintures, textiles	Ferrochromes	Chlorose, croissance réduite	Cancer des poumons, maladies du foie
Cuivre	Polissage, revêtement	Sulfures et chalcocites	Stress oxydatif	Atteintes rénales, troubles métaboliques
Mercure	Eruptions volcaniques, batteries	Elémentaire, inorganique et méthylée	Effets génotoxiques	Ataxie, cécité
Plomb	Galvanoplastie, exploitation minière	Organique	Inhibition de l'activité enzymatique	Domages neuronaux, néphropathie
Nickel	Emallage porcelaine, raffinerie d'argent	Sels inorganiques de fer et de soufre	Réduction de l'absorption des nutriments	Cancer des poumons et du nez
Sélénium	Combustion du charbon, exploitation minière	Sels inorganiques de sodium	Altération des propriétés protéiques	Dysfonctionnement du système endocrinien

En général, les polluants inorganiques comprennent l'arsenic, le cadmium, le plomb, le mercure, le chrome, l'aluminium, les nitrates, les nitrites et les fluorures. Les métaux lourds et les métalloïdes sont les principaux constituants des polluants inorganiques qui sont associés à des processus tels que l'exploitation minière et la combustion de matières fossiles, les déchets solides municipaux, les déchets industriels et les engrais (Borah et al., 2020).

Contrairement aux métaux lourds qui sont des types limités de polluants, les molécules organiques sont plus de millions de types avec divers groupes fonctionnels, propriétés et applications. Ces contaminants contiennent généralement des produits pharmaceutiques, des produits de soins personnels, des perturbateurs endocriniens, des pesticides, des détergents, des colorants organiques et des déchets organiques industriels courants (Lu et Astruc, 2020).

L'OMS a défini certaines normes tolérables de ces matériaux à l'intérieur de l'organisme. Lorsque ces standards sont dépassés, ces matières peuvent provoquer des dommages quasi-irréversibles, le plus souvent cancérigènes (Tableau 2).

Tableau 2. Valeur des lignes directrices de l'OMS pour certains polluants de l'eau.

Paramètre	Limitation	Paramètre	Limitation
<i>E. coli</i>	0/100 mL	Fer	0.3 mg/L*
Aluminium	0.2 mg/L*	Plomb	0.01 mg/L
Arsenic	0.01 mg/L*	Manganèse	0.1 mg/L*
Ammoniac	1.5 mg/L*	Nitrate	10 mg/L
Cadmium	0.003 mg/L	Sodium	200 mg/L*
Chlorure	250 mg/L*	Sulfate	250 mg/L*
Cuivre	2 mg/L	Zinc	3 mg/L*
Fluorure	1.5 mg/L	Sulfure d'hydrogène	0.05 mg/L*

N.B : *Peut ne pas être toxique mais pourrait donner lieu à des plaintes de consommateurs.

Les dommages induits par les agents polluants peuvent se répercuter à différentes échelles de l'organisme et peuvent atteindre même le patrimoine génétique. Les dommages génétiques se produisent naturellement de manière endogène dans les cellules suite à la respiration et le métabolisme mais aussi sous l'action des facteurs externes tels que les agents polluants. Ces dommages sont continuellement réparés par divers procédés de réparation de l'ADN présents dans les cellules. Cependant, lorsque le dommage génétique devient trop sévère pour la machinerie cellulaire à gérer, les lésions génétiques s'accumulent et peuvent conduire à la perturbation de la division et la prolifération cellulaire, la réplication de l'ADN, la cancérogenèse et même jusqu'à l'apoptose (Stice et al., 2019).

La génotoxicité est le processus par lequel un agent produit un effet délétère sur l'ADN et d'autres cibles cellulaires qui contrôlent l'intégrité du matériel génétique. Les agents génotoxiques sont ceux qui provoquent des altérations structurelles de l'ADN, entraînant des changements ou des réarrangements dans les gènes, et donc induisant des mutations. Une fois produites, ces modifications sont permanentes et donc héréditaires pour d'autres cellules (Lopez et al., 2012).

L'évaluation des dommages génétiques par une combinaison d'essais *in silico*, *in vitro* et *in vivo* permet de parvenir à une conclusion concernant le potentiel mutagène ou cancérogène des agents polluants.

Pour mettre en évidence les différentes méthodes de détection de génotoxicité et de cytotoxicité, les chercheurs ont utilisé des modèles animaux, végétaux et micro-organismes d'où le terme « bioindicateurs » qui a été utilisé pour la première fois par Clements (1920). En pratique, un bioindicateur peut être tout organisme animal, végétal ou microbien pouvant être utilisé pour formuler des conclusions sur les conditions environnementales auxquelles ils sont continuellement exposés.

Ces organismes peuvent être utilisés pour établir les variations géographiques et temporelles de la biodisponibilité des contaminants en mesurant les concentrations cumulées de substances chimiques dans l'ensemble du corps ou dans des tissus spécifiques. Ils fournissent des informations sur la santé des écosystèmes et réagissent bien à la présence ou à l'absence d'autres espèces, ainsi qu'à la présence ou à l'absence de contaminants. Les modifications physiologiques et comportementales spécifiques de ces organismes sont utilisées pour détecter les changements dans la santé environnementale.

Un organisme, pour être utilisé comme bioindicateur, doit être facilement identifié et échantillonné, être largement répandu dans la zone étudiée, avoir une faible mobilité et un long cycle de vie, avoir une bonne uniformité génétique sur toute la zone considérée et être présent tout au long de l'année (Stankovic et Stankovic, 2013). Certains indicateurs biologiques peuvent continuer à exister dans un environnement pollué mais subissent un stress physiologique qui se manifeste par une diminution du taux de croissance, une altération de la capacité de reproduction ou une modification du comportement.

Les plantes agissent comme source vitale de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Depuis le tout début jusqu'à nos jours, elles ont été utilisées comme indicatrices pour détecter les produits chimiques cytogénotoxiques, les plus courantes étant *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Zea mays*, *Crepis capillaris*, *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa* et *Allium sativum*. Certaines des caractéristiques exclusives de ces plantes, telles que leur

structure génétique simple, leur taux de croissance élevé, en ont fait des bioindicateurs fiables (Roy et al., 2019).

Parmi les espèces de plantes supérieures, *Allium cepa* a été utilisé pour évaluer les dommages causés à l'ADN, tels que les aberrations chromosomiques et les altérations du cycle mitotique. L'utilisation de l'oignon comme modèle de test pour détecter les mutagènes remonte aux années 40 afin d'évaluer un grand nombre d'agents chimiques, ce qui contribue à son application croissante dans le contrôle de l'environnement.

Le test d'*Allium cepa* est peu onéreux, aisément manipulable et présente des avantages par rapport à d'autres tests à court terme qui nécessitent des préparations préalables des échantillons testés, ainsi que l'ajout d'un système métabolique exogène. L'évaluation des impacts causés par les xénobiotiques par ce test l'a rendu un outil important pour les études de monitoring environnemental, où des résultats satisfaisants ont été rapportés (Leme et Marin-Morales, 2009).

Les dommages observés aux niveaux génotypique et cellulaire et qui sont induits par les différents xénobiotiques sont définis comme étant des marqueurs biologiques. Le Programme international sur la sécurité chimique dirigé par l'OMS et en coordination avec les Nations unies et l'Organisation internationale du travail ont défini un biomarqueur comme « toute substance, structure ou processus qui peut être mesuré dans le corps ou ses produits et qui influence ou prédit l'incidence d'un résultat ou d'une maladie » (Kalali, 2019). Il s'agit d'une caractéristique qui est mesurée et évaluée objectivement comme un indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou de processus ou réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. Il peut-être un prédicteur de la gravité, de l'apparition ou du rétablissement d'une maladie et peut être un marqueur indirect de la physiopathologie (Dubitzky et al., 2013).

Ainsi, un biomarqueur est en fait une perturbation d'une fonction normale d'un organisme. Pour cette raison, le domaine des marqueurs biologiques a besoin de comprendre la physiologie normale des organismes, comment celle-ci est perturbée par les contaminants et quelles conséquences les perturbations de fonction peuvent avoir en termes d'aptitude d'un organisme. Idéalement, les résultats devraient permettre d'évaluer un risque potentiel pour les populations, les communautés ou les écosystèmes. Ils sont utilisés pour surveiller les effets possibles de la contamination environnementale et donnent des « signaux d'alerte » précoces avant que des dommages sub-létaux ne se produisent. Les propriétés d'un bon marqueur biologique sont la facilité à mesurer, les mesures rapides et peu coûteuses, la mesure est spécifique à un type de substance toxique, la réponse est relative à la concentration (Nikinmaa, 2014).

L'exposition d'un individu à des facteurs environnementaux, industriels et alimentaires peut être évaluée en mesurant ces composants dans les aliments, l'air et l'eau ou par le biais de certaines analyses biométriques ou physiologiques tout en enregistrant le temps d'exposition, etc.

L'évaluation de cette exposition souffre d'un certain nombre d'incertitudes, notamment celles liées aux variations individuelles de la biodisponibilité, de la cinétique et du métabolisme. C'est pourquoi une attitude est illustrée par la mesure de la liaison des substances chimiques aux macromolécules biologiques telles que l'ADN et les protéines. De tels marqueurs pourraient refléter les conséquences des dommages causés à l'ADN. Pour estimer les expositions mutagènes et le risque de maladie, plusieurs méthodes, pour la plupart non spécifiques sont utilisés (Tennant, 1997).

Des tests à l'aide de modèles *in vitro* ou *in vivo* ont été conçus pour détecter les substances susceptibles de causer des dommages génétiques directement ou indirectement par un certain nombre de mécanismes. Le test des aberrations chromosomiques CA (*Chromosomal Aberrations*) est largement utilisé pour la détection des agents génotoxiques. Il fournit des informations relatives aux éventuels effets délétères produits au niveau chromosomique qui s'accumulent en raison de dommages génotoxiques tels que des insertions, des délétions, des translocations, des endoréductions, des polyploïdies, des aberrations chromatidiques, ainsi que des gains et des pertes chromosomiques (Lopez et al., 2012).

Les aberrations chromosomiques telles que les pertes de fragments ou de chromosomes entiers, peuvent entraîner la formation de cellules micronucléés, puisque les fragments et les chromosomes entiers ne peuvent pas être incorporés dans le noyau principal pendant le cycle cellulaire. Parmi tous les paramètres évaluables, les micronoyaux (MN) sont l'indicateur le plus efficace et le plus simple des dommages cytologiques, ce qui rend l'analyse de ce paramètre plus rentable pour évaluer la contamination de l'environnement en étant facilement observés dans les cellules filles comme une structure similaire au noyau principal, mais de taille réduite. Ainsi, les MN sont le résultat du développement de certaines aberrations chromosomiques, par exemple, des ruptures et des pertes de chromosomes (Leme et Marin-Morales, 2009).

D'autre part, l'ingestion des eaux contaminées provoquent le plus souvent des infections d'origine bactérienne, exposant ainsi l'organisme à des perturbations pouvant être létales. Les antibiotiques sont considérés comme le remède le plus efficace pour le traitement de diverses infections chez l'homme. Dans l'histoire de la médecine, la pénicilline a été marquée par les débuts de « l'âge d'or » des antimicrobiens. Divers antibiotiques de différentes familles ont été produits entre 1940 et 1962 pour le traitement de diverses attaques bactériennes. Au cours des deux ou trois dernières décennies, plusieurs nouveaux antibiotiques ont également été mis au point grâce à des modifications structurelles des précédents afin qu'ils restent efficaces. Ces

derniers ont été largement utilisés dans le traitement des infections bactériennes, les interventions chirurgicales, les traitements prophylactiques et le traitement du cancer. Il en est résulté une hausse de l'utilisation mondiale des antibiotiques, qui a atteint son paroxysme entre 2000 et 2010, avec une valeur de 40 milliards de dollars par an.

Sur la base des structures et des fonctions, les antibiotiques ont été classés en un large éventail de groupes. Dans un même groupe, les antibiotiques sont actifs contre les bactéries apparentées en raison de leurs propriétés pharmacologiques et chimiques similaires. Plusieurs classifications d'antibiotiques ont été élaborées en fonction de leur action de mécanisme ou de l'infection guérie. Les groupes d'antibiotiques les plus importants comprennent les aminoglycosides, β -lactames, céphalosporines, chloramphénicol, imidazoles, lincosamides, macrolides, quinolones, rifamycines, tétracyclines, et autres.

La découverte de la pénicilline en 1928 a conduit au développement des antibiotiques β -lactames qui se composent de l'anneau β -lactame. Les β -lactames ont été largement utilisés comme classe d'antibiotiques qui ont montré une activité contre les bactéries Gram-positives en interférant avec la synthèse du peptidoglycane dans la paroi cellulaire des bactéries. Chez l'homme, les β -lactames sont l'antibiotique le plus efficace jamais utilisé pour soigner les infections en raison de ses propriétés à large spectre telles que la disponibilité orale, l'activité, l'absence de toxicité, la pharmacocinétique et l'action bactéricide. Cette classe comprend les céphalosporines, la pénicilline (méthicilline, isoxazolyl pénicillines, amoxicilline), les carbapénèmes et les monobactames (Riaz et al., 2020).

Hélas, la disponibilité d'un large éventail de ces antibiotiques dans l'environnement, liée essentiellement à leur présence dans les rejets hospitaliers par excrétion en raison de leur faible métabolisation dans le corps humain, associée à une utilisation inappropriée, exerce une pression sélective sur la population bactérienne dans l'environnement favorisant alors l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) portant des gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) qui peuvent atteindre l'eau potable, les eaux de surface, les environnements marin et édaphique où la présence d'autres polluants augmente la pression supplémentaire pour favoriser la sélection de la résistance et, de ce fait, causer divers troubles en altérant les processus des écosystèmes, la toxicité à diverses espèces, suivies par la menace pour l'homme à travers la chaîne alimentaire. La propagation et l'acquisition des GRA par des bactéries cliniquement pertinentes ont conduit au développement de graves problèmes pour la santé humaine et animale (Jagstap, 2020).

La résistance à ces antibiotiques est de deux types ; celle qui est native ou celle qui est acquise. La résistance acquise résulte de mutations dans l'ADN de l'agent pathogène ou lors du transfert horizontal du gène pendant la conjugaison (le transfert de matériel génétique d'une

cellule bactérienne à une autre par contact physique direct entre les deux), la transduction (le transfert du matériel génétique d'une bactérie à un bactériophage, puis à une autre bactérie au cours du deuxième cycle d'infection du phage) et la transformation naturelle. Le sujet de préoccupation actuel est que cette résistance acquise rend l'infection difficile à traiter en clinique ou dans d'autres contextes écologiques.

Les molécules antibiotiques sont également produites par les microorganismes pour la compétition afin d'empêcher d'autres microbes de s'épanouir. Ainsi, pour survivre, les bactéries ont évolué au fil du temps afin de disposer d'une meilleure machinerie pour se défendre contre les antibiotiques. Les communautés bactériennes emploient diverses méthodes pour traiter les composants bactéricides afin de développer une résistance. Un des exemples est le groupe croissant des β -lactamases à large spectre, les enzymes CTX-M qui ont la voie la plus efficace pour le développement de la résistance. Des enquêtes récentes révèlent que chez les *E. coli* isolés de souches publiques et vétérinaires, on observe une augmentation spectaculaire de l'enzyme β -lactamase, une augmentation qui repose sur sa liaison à des plasmides transférés par conjugaison dans d'autres souches bactériennes (Afzaal et al., 2020).

Les enzymes β -lactamase constituent un mécanisme de défense bactérien qui permet d'hydrolyser la liaison amide des antibiotiques bêta-lactamines qui les inactivent. Selon la classification d'Ambler, les bêta-lactamases sont divisées en quatre classes (A, B, C et D) comprenant deux grandes familles : Sérine- β -lactamases (SBL) et Métallo- β -lactamases (MBL). Les SBL (classe A, C et D d'Ambler) sont des sérines-hydrolases, tandis que les MBL (classe B) produisent l'ion zinc dans le site actif sous forme de métallo-enzyme.

Les métallo- β -lactamases, en raison de leurs activités à large spectre dans l'hydrolyse des antibiotiques β -lactamines, représentent un danger considérable pour la santé humaine. Les MBL sont divisées en sous-classes B1, B2 et B3, et la sous-classe B1 est celle qui présente la plus grande pertinence clinique et qui apparaît le plus souvent parmi les MBL. Actuellement, il n'existe pas d'inhibiteur puissant contre cette enzyme ; il est donc devenu indispensable de lui trouver un stoppeur.

Les produits naturels (PN) constituent une ressource sûre pour l'usage humain et une véritable alternative valable aux substances médicamenteuses à petites molécules. Les PN sont des métabolites secondaires qui ont été sélectionnés au fil des siècles pour améliorer la santé humaine, et ils sont dérivés de sources naturelles, par exemple des micro-organismes, des plantes et des animaux, qui ont une activité biologique précieuse et considérable (Salari-jazi et al., 2020).

Les produits phytochimiques ayant une activité biologique peuvent être divisés en plusieurs catégories selon leur structure chimique et leur mécanisme d'action (Beoletto et al., 2016) :

- Les phénols et les acides phénoliques : ils inhibent les enzymes microbiennes qui interagissent avec les groupes sulfhydriles ou par des interactions non spécifiques avec les protéines. Ils sont efficaces contre les virus, les bactéries et les champignons.

- Les quinones : ils affectent les adhésines de surface des cellules, les polypeptides de la paroi cellulaire et les enzymes liées aux membranes.

- Les flavones et flavonoïdes : leur activité biologique est attribuée à la capacité de former un complexe avec les parois cellulaires bactériennes et de perturber les membranes microbiennes.

- Les tannins : ces composés inactivent les adhésines microbiennes, les enzymes, l'enveloppe cellulaire, les protéines de transport, les polysaccharides, etc.

- Les coumarines : on a constaté qu'elles inhibent les microorganismes *in vitro*.

- Les terpénoïdes : leur mécanisme d'action implique la perturbation de la membrane par des composés lipophiles.

- Les alcaloïdes : ils ont la capacité de s'insérer dans l'ADN, ce qui leur confère un effet antimicrobien.

- Les lectines : ils ont formé des canaux ioniques dans la membrane microbienne et favorisent l'inhibition compétitive de l'adhésion des protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte.

Ces produits naturels et leurs dérivés peuvent être utilisés comme alternative efficace pour contrebalancer l'antibiorésistance des microorganismes. Cependant, des essais *in vitro* et *in vivo* demeurent indispensables pour évaluer cette réponse biologique. Les avancées en biotechnologies ont permis de mettre en œuvre des approches *in silico* très convaincantes afin de renforcer les connaissances et assister les essais *in vitro* et *in vivo*. Ceci se traduit par la mise en place de modèles et de logiciels puissants permettant d'étudier les interactions entre les différentes molécules, on parle de docking moléculaire.

Ces dernières années, le docking moléculaire a été utilisé avec succès pour étudier le mécanisme de la biodégradation dans le cadre de la réhabilitation de l'environnement, bien que la science médicale et la biologie en soient les principaux domaines d'application. C'est une méthode très pratique et peu coûteuse pour comprendre le mécanisme de réaction des molécules avec des ligands avec une grande précision (Liu et al., 2018).

Les méthodes *in silico* sont appliquées dans de nombreux domaines pour l'évaluation de la toxicité et la biodégradation des polluants environnementaux. Ces approches sont basées sur des modèles mathématiques et statistiques exécutés sous des plateformes informatiques et s'appuient sur divers domaines scientifiques notamment la génomique, la protéomique, la bioinformatique,

la modélisation moléculaire, la simulation de la dynamique moléculaire (SDM) et un algorithme spécialisé pour la prédiction des cheminements (Singh et al., 2020).

La démarche *in silico* simplifie non seulement le problème à résoudre *in vitro* mais fournit également de nouvelles modalités d'exécution de la tâche. C'est des stratégies qui sont appliquées dans de nombreux domaines tels que la découverte de médicaments, le génie génétique, la phylogénétique et l'ingénierie des protéines (Singh et al., 2014).

Le docking moléculaire est une procédure de calcul qui tente de prédire efficacement les conformations liées et l'affinité de liaison d'une macromolécule (récepteur ou enzyme) et d'une petite molécule (ligand) (Trott et Olson, 2009). Au cours des deux dernières décennies, plus de 60 outils et programmes d'arrimage différents ont été développés pour un usage tant académique que commercial tels que DOCK, AutoDock, FlexX, Surflex, GOLD, ICM, Glide, Cdocker, LigandFit, MCDock, FRED, MOE-Dock, LeDock, AutoDock Vina, rDock, UCSF Dock et bien d'autres. Parmi ces programmes, AutoDock Vina, GOLD et MOE-Dock ont prédit les plus hautes poses avec les meilleurs scores (Pagadala et al., 2017). L'utilisation d'AutoDock a contribué à la découverte de plusieurs médicaments notamment des inhibiteurs de l'intégrase du VIH1 (Schames et al., 2004).

2. Objectif

Le présent travail consiste en une évaluation des effets cytotoxique et génotoxique qui peuvent être induits par la consommation de l'eau de robinet de la ville de Tiaret en utilisant le test d'*Allium cepa*.

De plus, l'approche de modélisation biologique via l'étude *in silico* est utilisée pour la recherche de molécules actives issues de produits naturels comme inhibiteurs des enzymes 'New Delhi Metallo- β -lactamases (NDM-1)' responsables de l'antibiorésistance bactérienne.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

L'altération et la modification de la qualité physico-chimique et biologique de l'eau dues à des activités anthropiques se répercutent sur la santé humaine par des pathologies le plus souvent létales. Ceci se présente comme un enjeu majeur afin de déployer tous les efforts et connaissances pour remédier à ce fléau.

Le présent travail est organisé en deux parties ; la première partie consiste en une évaluation de la qualité des eaux de la région de Tiaret à travers l'étude des effets cytotoxiques et génotoxiques *in vitro*, qui peuvent être induits par la consommation de l'eau de robinet, par le test d'*Allium cepa*. Cependant, la deuxième partie traite la contamination des eaux par les antibiotiques de la famille des β -lactames à travers une approche de modélisation biologique qui vise à chercher des molécules actives, issues des produits naturels de terroir, qui peuvent être utilisées comme inhibiteurs potentiels des enzymes β -lactamases des bactéries afin de contrebalancer leur résistance aux antibiotiques.

1. Etude *in vitro* de la cytotoxicité et la génotoxicité

Le test d'*Allium cepa* est utilisé pour détecter les effets cytotoxiques et génotoxiques qui peuvent être dus à la consommation de l'eau de robinet dans la ville de Tiaret. Ce test peu onéreux et aisément manipulable est proposé comme outil indispensable complémentaire aux analyses physicochimiques ordinaires des eaux destinées à l'usage public.

1.1. Matériel

Les échantillons d'eau de robinet ont été collectés dans des bouteilles en verre hermétiquement fermées et conservés à une température de 4 °C dans le laboratoire.

Les bulbes d'oignons *Allium cepa* L. achetés du marché local ont été sélectionnés selon leur taille et leur aptitude à développer des racines lorsqu'ils sont mis en contact avec les échantillons d'eau recueillis.

1.2. Test *Allium cepa*

Suivant la procédure décrite par Fiskesjö (1985), avec quelques modifications, des bulbes d'oignons *Allium cepa* L. (2n= 16) de taille égale sont sélectionnés. Les bulbes séchés ou attaqués par la moisissure doivent être jetés. Il faut enlever aussi les écailles extérieures des bulbes et la

partie inférieure brunâtre, l'anneau des primordia de la racine étant laissé intact. Ensuite, chaque bulbe est mis en contact avec de l'eau de l'échantillon à analyser. Les oignons ne doivent pas entamer le processus de la pousse des feuilles vertes, car la perturbation de la croissance des feuilles peut également être utilisée comme paramètre qualifié comme effet traitement.

1.3. Observation microscopique

Après 48 heures d'exposition, les extrémités des racines des bulbes d'oignons sélectionnés au hasard pour chaque traitement sont soumises à l'observation microscopique. L'extrémité des racines (1 à 2 cm de longueur) de chaque bulbe est fixée dans la solution Carnoy (éthanol : acide acétique glacial 3:1 (v/v)) et conservée pendant 24 h à 4 °C.

Après fixation, les extrémités des racines sont transférées dans une solution d'alcool à 70 % et stockées à 4 °C jusqu'au analyses. Au début du traitement, les extrémités des racines sont hydrolysées dans 1 N d'HCl à 60 °C pendant 5 à 10 min et sont lavées plusieurs fois à l'eau distillée.

Ensuite, les racines sont placées sur des lames de verre avec une goutte de carmine acétique pour la coloration et laissées pendant 5 à 20 min. Une lamelle de couverture est placée sur la lame en exerçant une légère pression pour faire étaler les cellules à la surface de la lame. Les lames sont examinées au microscope optique ($\times 400$ et $\times 1000$) afin d'analyser les paramètres cytogénotoxiques.

L'analyse microscopique doit permettre d'évaluer la présence de micronoyaux, de bourgeons nucléaires, de noyaux binucléés et des noyaux condensés et des aberrations chromosomiques dans des cellules en phases de divisions métaphasique, anaphasique et télophasique (Pathiratne et Hemachandra, 2015).

2. Etude *in silico* pour la recherche des inhibiteurs des enzymes β -lactamases

La dégradation de la qualité des eaux est due à la présence des polluants qui sont parvenus à se frayer un chemin à travers les activités anthropiques. Ces dernières années, les antibiotiques ont pénétré dans les lacs et l'environnement côtier suite au déversement de l'eau des rivières, les rejets des eaux usées principalement hospitalières et les activités d'aquaculture.

Les lacs d'eau douce sont exploités comme source d'eau potable et peuvent servir de milieu idéal pour l'accumulation et la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques en raison de la pression sélective exercée par ces derniers. Les antibiotiques peuvent également être trouvés dans les eaux souterraines qui sont la principale source d'eau potable dans les régions où l'approvisionnement en eau est décentralisé. Les antibactériens proviennent de champs épandus avec du fumier animal, de sols contaminés par des décharges ou de déversements de systèmes septiques (Jufer et al., 2018).

Cette partie du travail comprend l'incorporation de la biologie computationnelle à notre étude tout en proposant une approche de modélisation, qui peut ménager avec une certaine précision les travaux *in vitro* et *in vivo*, pour la recherche des inhibiteurs des enzymes responsables à l'antibiorésistance notamment les β -lactamases.

L'amarrage ou le docking moléculaire est une procédure de calcul qui tente de prédire efficacement la liaison non covalente de macromolécules ou, plus fréquemment, d'une macromolécule (récepteur ou enzyme) et d'une petite molécule (ligand).

L'objectif est de prédire les conformations liées et l'affinité de liaison (Trott et Olson, 2009). Ce processus comporte deux grandes étapes, la première est un algorithme de recherche et la seconde est une fonction de scoring (classement). L'algorithme de recherche peut différencier les changements de conformation du ligand. Les fonctions de scoring classifient généralement les différentes formes extraites par l'algorithme de recherche. Une fonction de score efficace peut facilement mettre en évidence la structure obtenue expérimentalement à partir d'autres structures prédites récupérées par l'algorithme de recherche (Banaganapalli et al., 2019).

2.1. Matériel

2.1.1. Microordinateur

Un ordinateur portable doté d'un processeur Intel® Core™ i5-2430M CPU @ 2.40 GHz 2.40 GHz avec une mémoire installée (RAM) de 6.00 Go et une carte graphique Intel® HD Graphics 3000 sous Windows 10, système d'exploitation 64 bits a été utilisé pour l'exécution du programme.

2.1.2. Software

a. AutoDock Vina

AutoDock Vina est un nouveau programme pour l'arrimage moléculaire et le criblage virtuel qui succède à AutoDock, il fournit de meilleures données d'analyses et dispose d'une procédure sophistiquée d'optimisation. Ce programme est constitué d'une interface utilisateur graphique appelée AutoDockTools (version 1.5.7rc1 Mar_27_13), ou ADT, qui aide l'utilisateur à configurer facilement les deux molécules pour l'amarrage, lance les tâches de calcul et permet également de visualiser interactivement les résultats du docking en 3D (Trott et Olson, 2009).

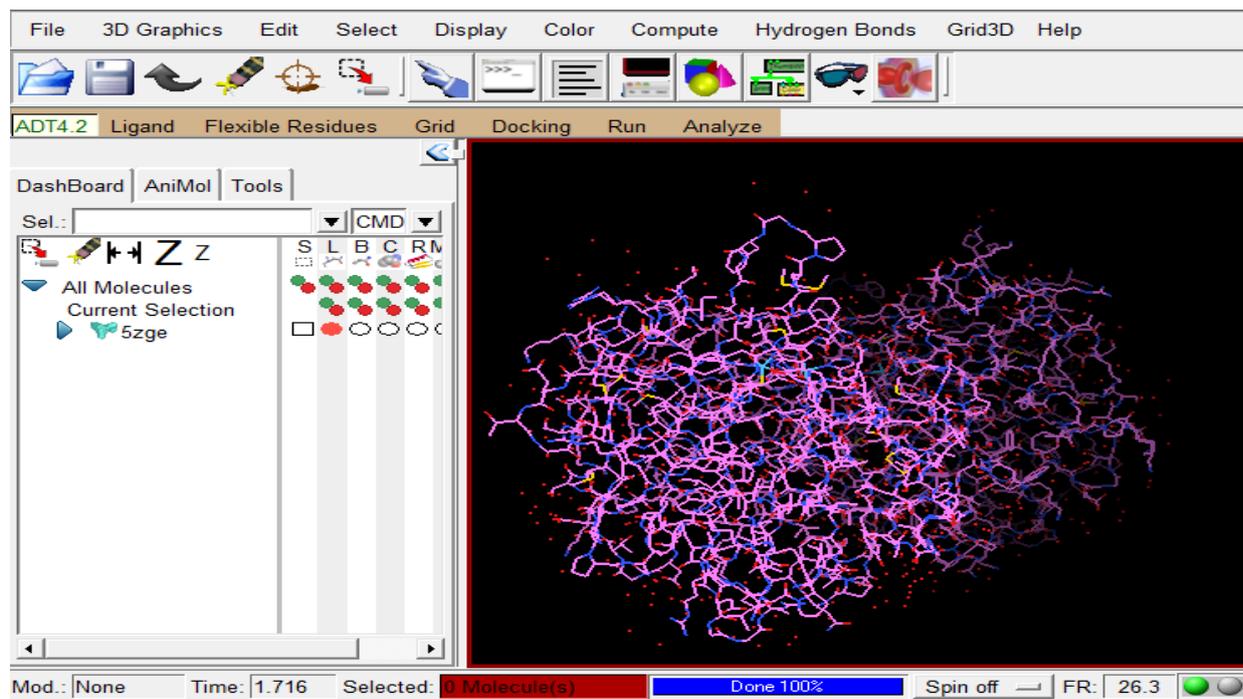


Figure 1. Fenêtre de visualisation AutoDock Tools.

b. *Discovery Studio Visualizer*

Discovery Studio Visualizer (v20. 1.0. 19295) est une suite logicielle complète pour l'analyse et la modélisation des structures moléculaires, des séquences et d'autres données pertinentes. Ce produit peut être utilisé pour ouvrir les données générées par d'autres logiciels et il comprend des fonctionnalités de visualisation et d'édition des données ainsi que des outils permettant d'effectuer des analyses de données de base, une gamme d'options de visualisation 3D (afficher/cacher les atomes, les résidus, les molécules d'eau, les ligands etc.), une capacité de mesurer et afficher les distances et les angles de torsion et de montrer les liaisons hydrogène. L'application fonctionne sous Windows et Linux et constitue un environnement de bureau entièrement intégré qui donne accès aux fonctions standard du système d'exploitation (BIOVIA, 2020).

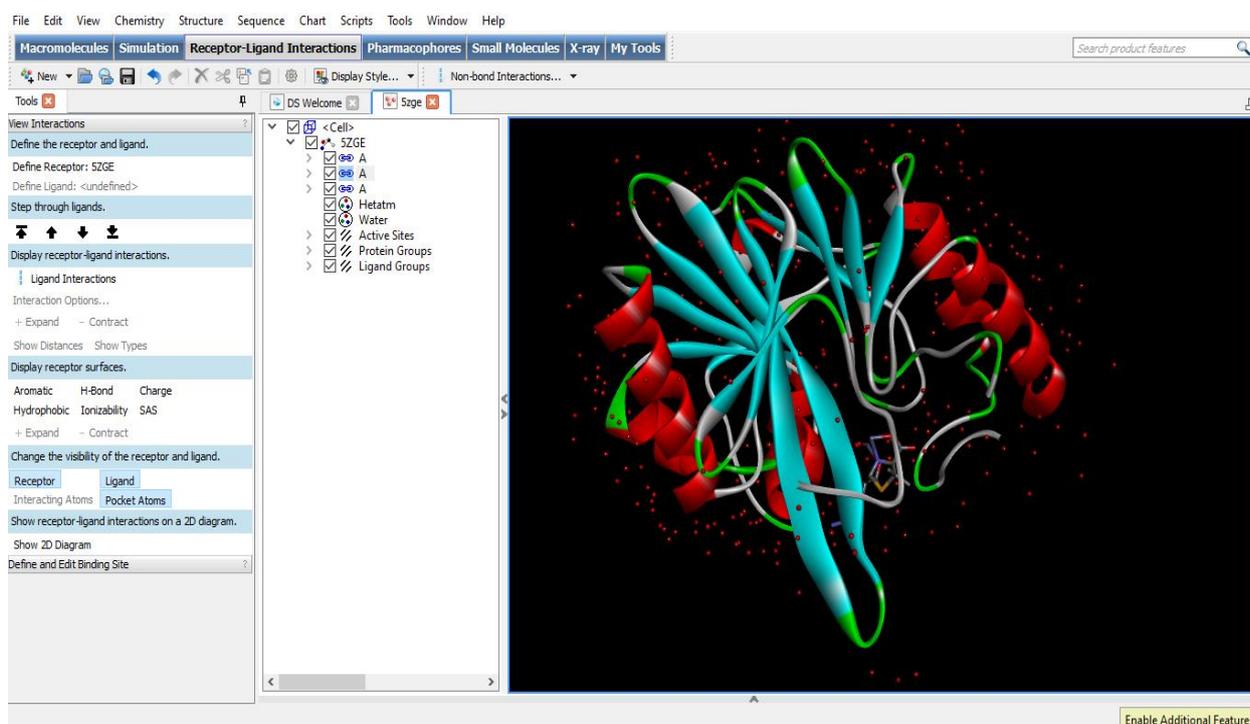


Figure 2. Fenêtre de visualisation *Discovery Studio Visualizer*.

c. UCSF Chimera (ou Chimera)

Chimera est un programme de visualisation et d'analyse interactive des structures moléculaires et des données associées, y compris les plans de densité, les trajectoires et les alignements de séquences. Des images et des animations de haute qualité peuvent être générées. Chimera comprend une documentation complète et est gratuit pour les universités, le gouvernement, les organisations à but non lucratif et l'utilisation personnelle. Le développement de Chimera a été soutenu par les *National Institutes of Health* (Pettersen et al., 2004).

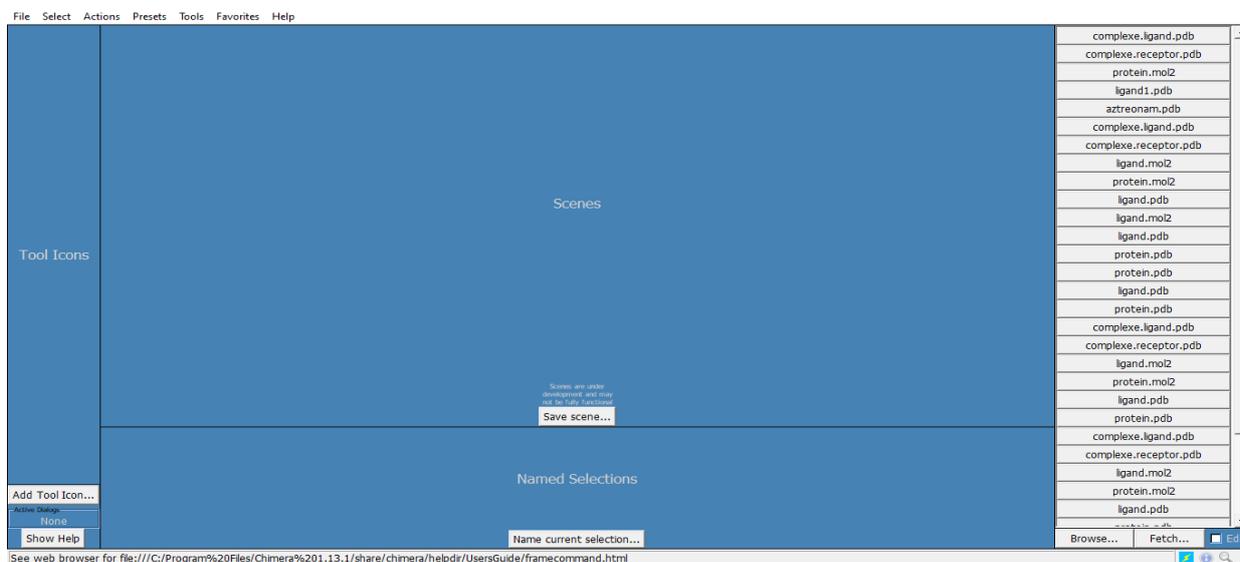


Figure 3. Interface graphique de Chimera.

2.1.3. Banques de données

a. Banque de données protéiques, *Protein Data Bank* (PDB)

La banque de données sur les protéines (PDB) (<http://www.rcsb.org/>) est l'archive mondiale unique des données sur la structure tridimensionnelle (3D) des macromolécules biologiques déterminées expérimentalement. Ces structures sont principalement déterminées par les deux méthodes la cristallographie à rayons X et la RMN. L'archive centrale de la PDB abrite les coordonnées atomiques 3D de plus de 144 000 spécimens de protéines, d'ADN/ARN et de leurs complexes avec des métaux et des petites molécules, ainsi que des données expérimentales et des métadonnées associées. Les données de la PDB sont utilisées par des chercheurs, des éducateurs, des ressources bioinformatiques spécialisées et d'autres utilisateurs de tous les continents habités et de toutes les nations souveraines reconnues par les Nations unies (Berman et al., 2000).

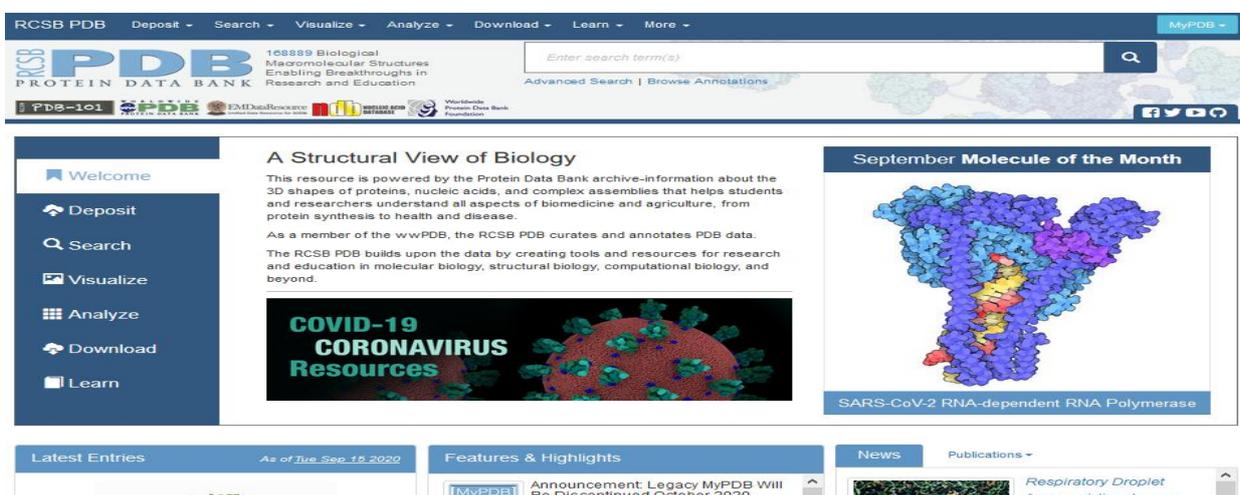


Figure 4. Interface du site web PDB.

b. PubChem

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) est une ressource d'information sur les produits chimiques au *U.S. National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Depuis son lancement en 2004, elle est devenue une ressource d'information chimique essentielle pour la communauté des chercheurs en biomédecine et le grand public. Cette base de données regroupe principalement des petites molécules, mais aussi des molécules plus larges telles que les nucléotides, les glucides, les lipides, les peptides et les macromolécules modifiées chimiquement, et recueille des informations sur les structures chimiques, les identificateurs, les propriétés chimiques et physiques, les activités biologiques, les brevets, la santé, la sécurité, les données de toxicité et bien d'autres encore. PubChem renferme 111.325.936 structures chimiques uniques (Kim et al., 2018).

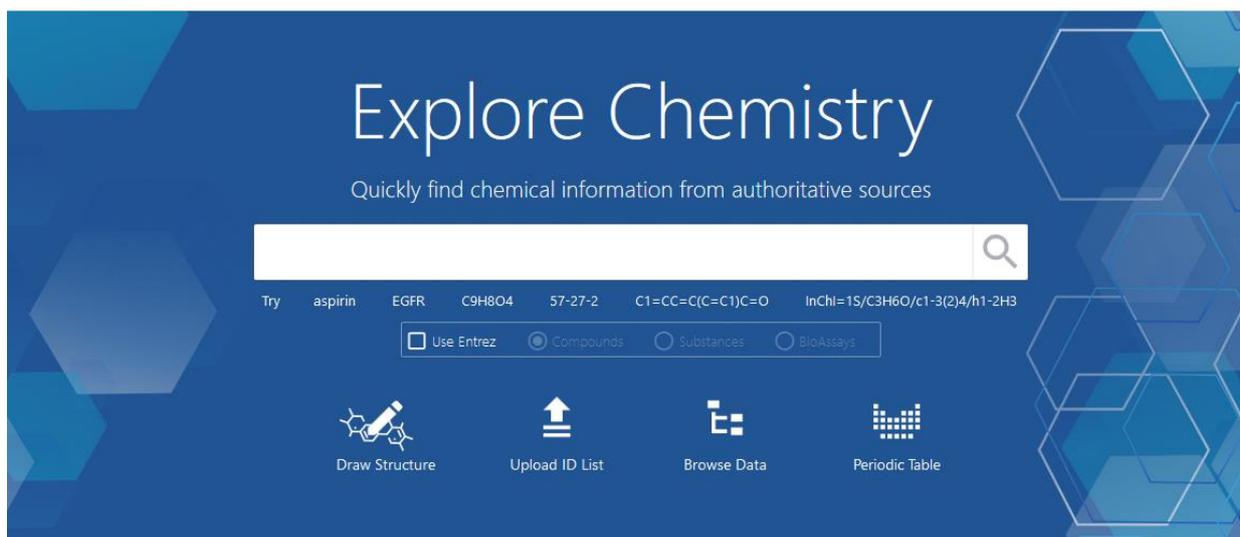


Figure 5. Interface du site web PubChem.

c. Base de données sur l'activité des produits naturels et les sources d'espèces, *natural product activity and species source database (NPASS)*

NPASS (<http://bidd.group/NPASS/index.php>) est une base de données développée qui fournit une information détaillée librement accessible sur les sources d'espèces et les activités biologiques des produits naturels. Les informations sur les espèces proviennent principalement de l'inspection manuelle des publications. Cette base de données comprend 25.041 organismes sources et 35.032 produits naturels (Zeng et al., 2017).

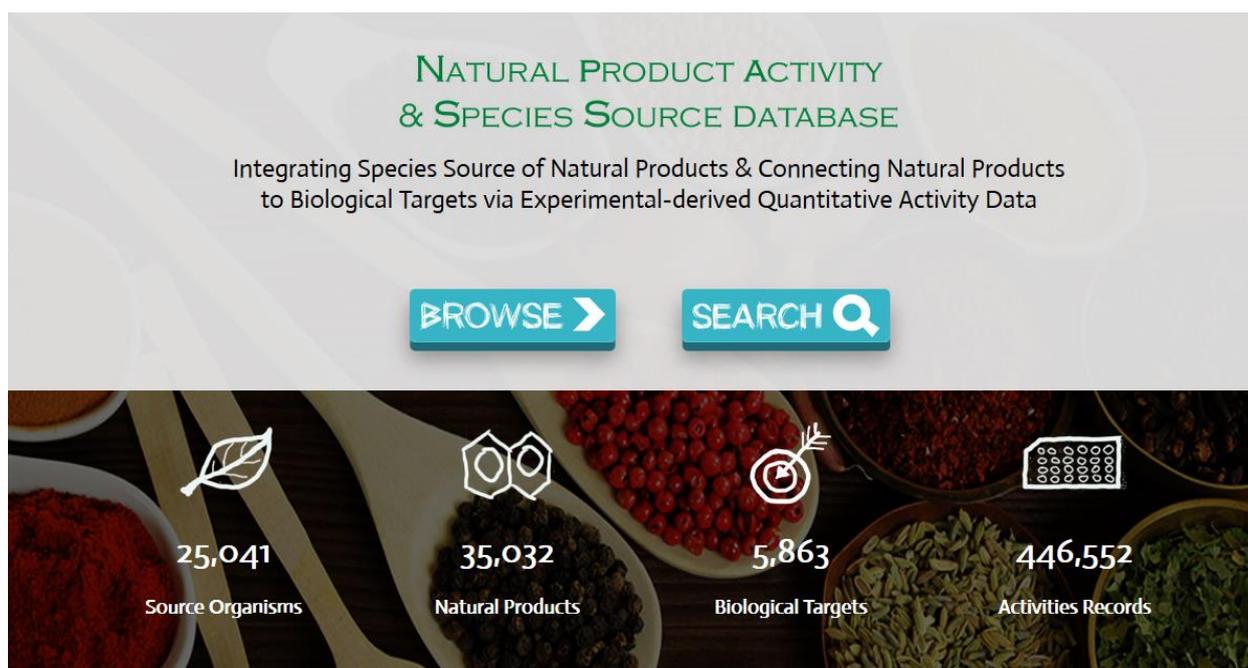


Figure 6. Interface du site web NPASS.

2.2. Méthodes

2.2.1. Choix du récepteur

D'innombrables vies humaines ont été sauvées grâce à l'antibiothérapie dans le monde et celle-ci reste une option importante pour le traitement de diverses maladies infectieuses bactériennes. Après l'introduction de la pénicilline, on a commencé à synthétiser les autres dérivés efficaces (Davari et al., 2017).

Les antibiotiques bêta-lactamines sont depuis longtemps devenus l'arme la plus puissante pour la population contre les infections bactériennes. Ces composés peuvent bloquer le croisement des chaînes de peptidoglycanes pendant la biosynthèse de la paroi cellulaire des bactéries. Toutefois, l'hydrolyse des antibiotiques bêta-lactamines par les enzymes bêta-lactamases est l'un des mécanismes de résistance qui constitue une menace prépondérante pour la santé humaine (Wang et al., 2020).

La base de données PDB regroupe une dizaine de structures pour les bêta-lactamases, notamment la NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) complexée à des ligands (antibiotiques et inhibiteurs) ou libre. Parmi elles, trois structures enzymatiques élaborées grâce à la cristallographie aux rayons X sont caractérisées par une bonne résolution. Elles sont identifiées par les codes 5ZGE, 4EY2 et 5O2E. Afin de mener à bien le processus du docking, nous avons retenu celle qui représente la meilleure résolution (5ZGE), soit une valeur de 1.00 Å. Les paramètres des structures sont regroupés dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques des NDM-1 sélectionnées.

CODE PDB	Organisme	Ligand cocrystallisé	Méthode	Résolution (Å)	Référence
5ZGE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicilline hydrolysé	Cristallographie aux rayons X	1.00	Zhang et Hao, 2018
4EY2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Méthicilline hydrolysé	Cristallographie aux rayons X	1.17	Strynadka et King, 2012
6KXI	<i>Escherichia coli</i>	Inhibiteur NO9	Cristallographie aux rayons X	1.38	Wachino, 2020

La structure haute résolution de la NDM-1 (1 Å) a été téléchargé à partir de *The Protein Data Bank* (ID : 5ZGE) sous format *.pdb*. Cette composition est d'un poids total de 52.29 kDa (kilodalton) et contient des dimères (chaînes A et B) NDM-1 avec l'ampicilline comme ligand cocrystallisé. Le monomère 5ZGE est un polypeptide à chaîne unique longue de 241 acides aminés.

2.2.2. Choix des antibiotiques et des composés naturels inhibiteurs

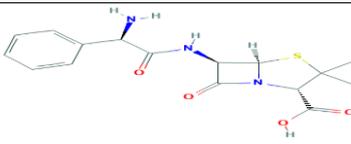
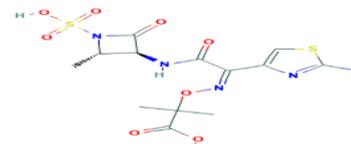
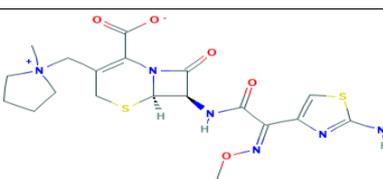
Ces dernières années, l'attention s'est portée de plus en plus sur les antimicrobiens d'origine végétale comme alternative aux antibiotiques, pour leur efficacité. En outre, il a été constaté que certains produits naturels pouvaient renforcer l'activité d'antibiotiques courants présentant un effet synergique. Outre leur efficacité, un avantage important serait que les bactéries seraient moins prédisposées à développer une résistance, car les composés naturels pourraient s'attaquer simultanément à plusieurs cibles bactériennes (Martelli et Giacomini, 2018).

Dans le sillage de ce grave problème de résistance aux antibiotiques, il devient impératif de trouver des inhibiteurs qui peuvent rendre les antibiotiques actuels fonctionnels et utiles. Dans la présente étude, nous avons sélectionné une série de différents composés naturels pour trouver des inhibiteurs potentiels appropriés de la NDM-1.

Un ensemble de 10 antibiotiques bêta-lactamines comprenant différentes sous-familles comme les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et un inhibiteur clinique standard ont été amarrés à la NDM-1 pour trouver le traitement présentant l'énergie de liaison moyenne la plus élevée.

La collection des composés naturels et des antibiotiques β -lactamines a été retenue à partir des deux bases de données, PubChem et NPASS sous formats SDF 3D et mol, respectivement. Les structures chimiques employées dans cette étude sont représentées dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4. Représentation des structures 2D et les formules des antibiotiques testés.

Antibiotique	Structure deux dimensionnelle	Formule moléculaire
Ampicilline		<u>C₁₆H₁₉N₃O₄S</u>
Aztreonam		<u>C₁₃H₁₇N₅O₈S₂</u>
Cefepime		<u>C₁₉H₂₄N₆O₅S₂</u>

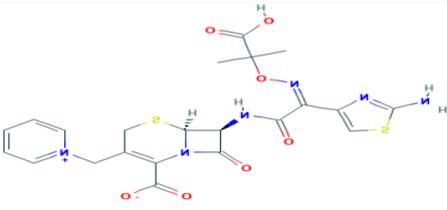
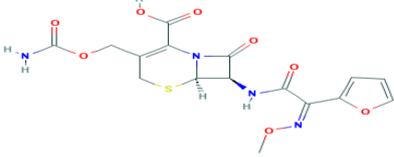
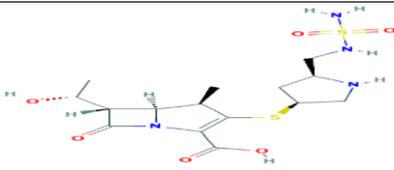
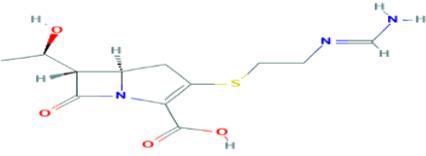
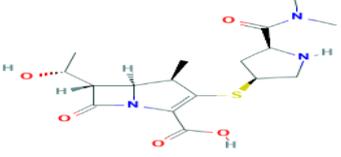
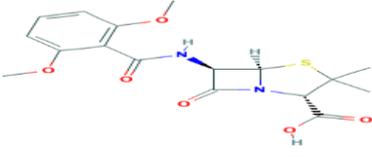
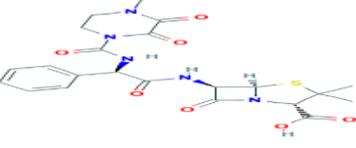
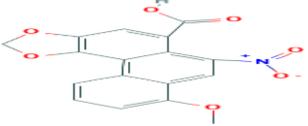
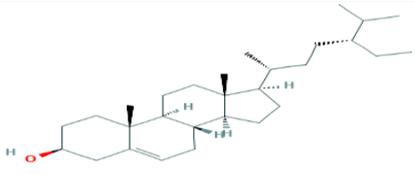
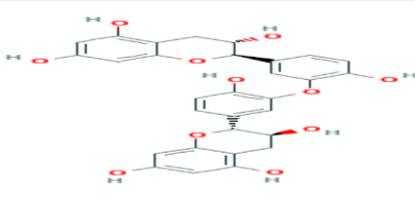
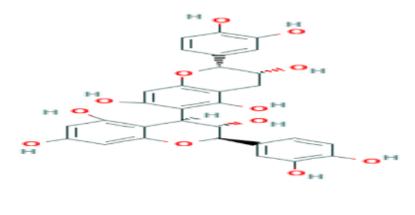
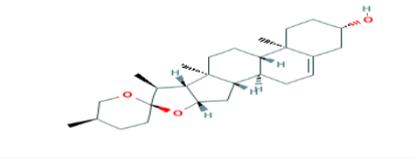
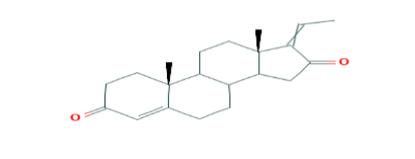
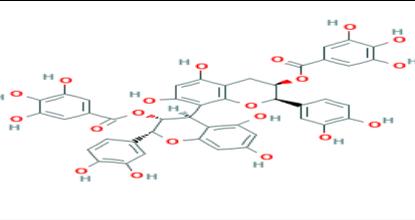
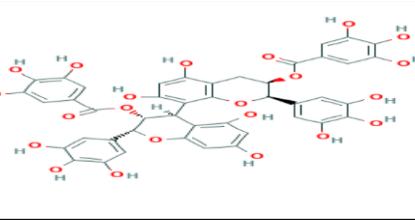
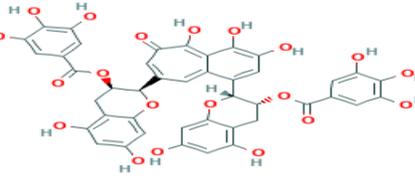
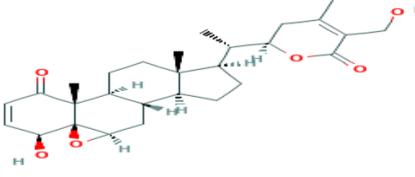
Ceftazidime		$C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$
Cefuroxime		$C_{16}H_{16}N_4O_8S$
Doripénem		$C_{15}H_{24}N_4O_6S_2$
Imipénem		$C_{12}H_{17}N_3O_4S$
Meropénem		$C_{17}H_{25}N_3O_5S$
Méthicilline		$C_{17}H_{20}N_2O_6S$
Pipéracilline		$C_{23}H_{27}N_5O_7S$

Tableau 5. Représentation des structures 2D et les formules des produits naturels testés.

Produit naturel	Structure deux dimensionnelle	Formule moléculaire
Acide aristolochique		$C_{17}H_{11}NO_7$

β-sitostérol		C ₂₉ H ₅₀ O
Catéchine-(3'->0->3''')-Afzelechine		C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁
Catéchine-(4Alpha->6)-Epicatechine		C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Diosgénine		C ₂₇ H ₄₂ O ₃
E-guggulstérol		C ₂₁ H ₂₈ O ₂
Procyanidine B-2 3,3'-Di-O-Gallate		C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀
Prodelphinidine B-2 3,3'-Di-O-Gallate		C ₄₄ H ₃₄ O ₂₂
Digallate de théaflavine		C ₄₃ H ₃₂ O ₂₀
Withaférine A		C ₂₈ H ₃₈ O ₆

2.2.3. Protocole du docking moléculaire

a. Préparation du récepteur et des ligands

Le monomère de la protéine a été préparé pour l'amarrage moléculaire en dissociant les deux structures de l'enzyme (chaîne A et B) et les molécules d'eau (les molécules H₂O peuvent assurer une liaison avec le ligand et ainsi créer des liaisons hydrogènes). Les différentes coordonnées du site de fixation du ligand (antibiotique) avec le récepteur (enzyme) à savoir les valeurs x, y et z en 3D (*grid box*) sont d'abord déterminées pour procéder à la libération du site de fixation et la réalisation du docking (les ligands qui occupent le site de fixation doivent être éliminés pour effectuer le docking). Ensuite, la charge totale du monomère protéique est calculée après l'addition des molécules hydrogènes à ce monomère via le logiciel Chimera.

Le docking est effectué par la suite avec le programme AutoDock Tools. Les coordonnées du centre de la *Grid Box* ont été fixées à 2.55 Å, 48.67 Å, 107.03 Å pour les axes x, y et z respectivement avec un espacement de 0.375 Å. Une fois le monomère est préparé, les ligands sélectionnés sont testés pour leur compatibilité successivement.

b. Exécution de AutoDock Vina

Afin de permettre à AutoDock Vina de fonctionner et exécuter ses fonctions de score, un document texte de configuration comportant les entrées est préparé avant l'exécution en mode invite de commande.

La procédure du docking par AutoDock Vina s'exécute généralement entre 2 à 10 minutes. Les résultats du docking sont présentés sous formes de plusieurs fichiers pouvant être visualisés sur AutoDock Tools ou Discovery Studio Visualiser.

- Les fichiers contenant les informations sur l'enzyme et le ligand initialisés (protéine.pdbqt et ligand.pdbqt).
- Le fichier contenant des informations sur les scores des différentes poses ou tentatives d'arrimage réalisées entre le récepteur et le ligand (log.txt). Les poses sont classées par ordre énergétique de liaison. La conformation ayant l'énergie la plus réduite est placée en premier.
- Le fichier contenant le ligand docké à la protéine avec toutes les conformations réalisées (complexe.pdbqt).
- Les fichiers contenant le ligand docké à la protéine qui sont affichés séparément (complexe1_ligand1.pdbqt, complexe1_ligand2.pdbqt etc.).

c. Validation du docking moléculaire

Afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de la cible enzymatique étudiée, il est indispensable, dans un premier temps, de tester la fiabilité du programme de docking utilisé dans cette étude via deux tests.

Le premier consiste à calculer les écarts quadratiques moyens ou RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre la position du ligand simulée par le logiciel et celle déterminée expérimentalement. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugée au moyen de la déviation quadratique moyenne (RMSD) entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Un seuil maximal de 2 Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne d'une mauvaise position.

Quant au deuxième test, il consiste en l'analyse visuelle pour confirmer les résultats du test RMSD. Elle permet de montrer si la pose simulée d'un ligand se superpose avec celle de référence. Ce test conforte davantage la conclusion tirée suite au test de fiabilité par RMSD et confirme la performance du modèle.

Résultats

Résultats

1. Cytotoxicité et génotoxicité *in vitro*

Lors de l'exposition des racines d'*Allium cepa* aux échantillons d'eau de robinet collectés pendant 48 h, des anomalies nucléaires caractérisées par des altérations morphologiques dans les noyaux d'interphase se sont distinguées par la formation de cellules micronucléées (Figure 7). De plus, des anomalies chromosomiques illustrées par des ponts chromosomiques lors de l'anaphase ont pu être observées à travers l'évaluation microscopique (Figure 8).



Figure 7. Cellules micronucléées (1 et 2).

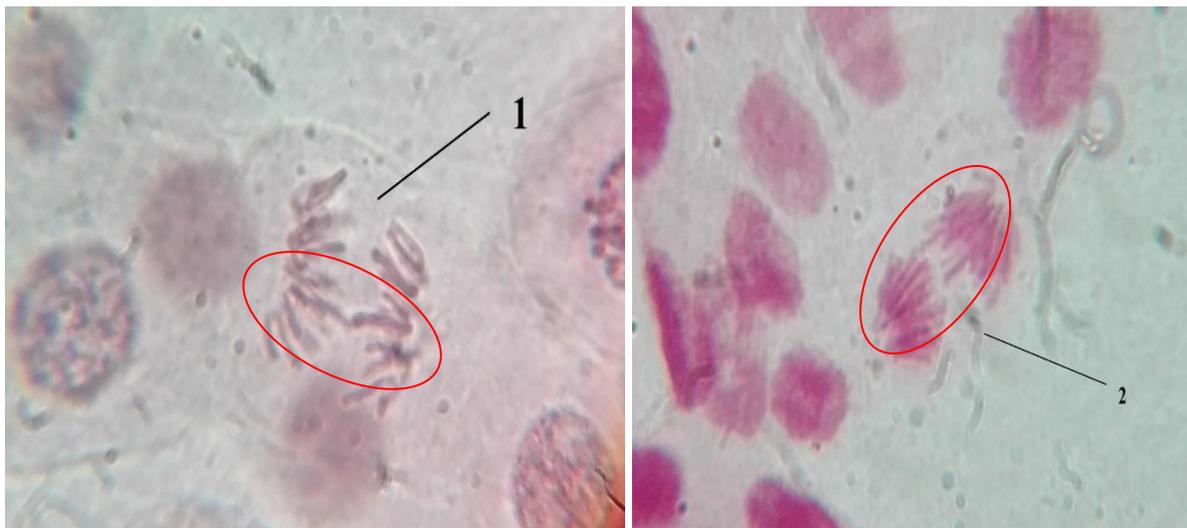


Figure 8. Anaphase avec pont chromosomique.

2. Inhibiteurs de β -lactamases *in silico*

2.1. Validation du protocole de docking moléculaire

a. Test RMSD

Avant d'entamer l'étude de la potentielle inhibition des β -lactamases par les produits naturels, le protocole d'arrimage a été validé en conduisant un redocking des ligands cocrystallisés avec la protéine NDM-1 et en comparant la valeur RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) entre les ligands du complexe cristallographique avec ceux qui sont amarrés par le programme du docking.

Le test de fiabilité du programme AutoDock Vina a été réalisé sur 3 complexes de la New Delhi Metallo- β -lactamase disponibles sur la PDB, et le logiciel a pu simuler avec précision les interactions, avec des valeurs de RMSD inférieures à 2 Å (Tableau 6).

Tableau 6. Valeurs de RMSD des trois complexes NDM-1 étudiés.

Identifiant PDB	Ligand cocrystallisé	RMSD (Å)
4EY2	Méthicilline hydrolysée	1.7
5ZGE	Ampicilline hydrolysée	1.2
6KXI	Inhibiteur NO9	0.4

Cette constatation valide donc le programme de docking moléculaire en reproduisant pratiquement la même orientation du ligand et la même forme de liaison que celle trouvée dans la structure déterminée expérimentalement.

b. Analyse visuelle

Une autre étape indispensable pour confirmer les résultats du RMSD est celle de l'analyse visuelle. Elle permet de déterminer la superposition du ligand simulé par le logiciel avec celui qui est cocrystallisé.

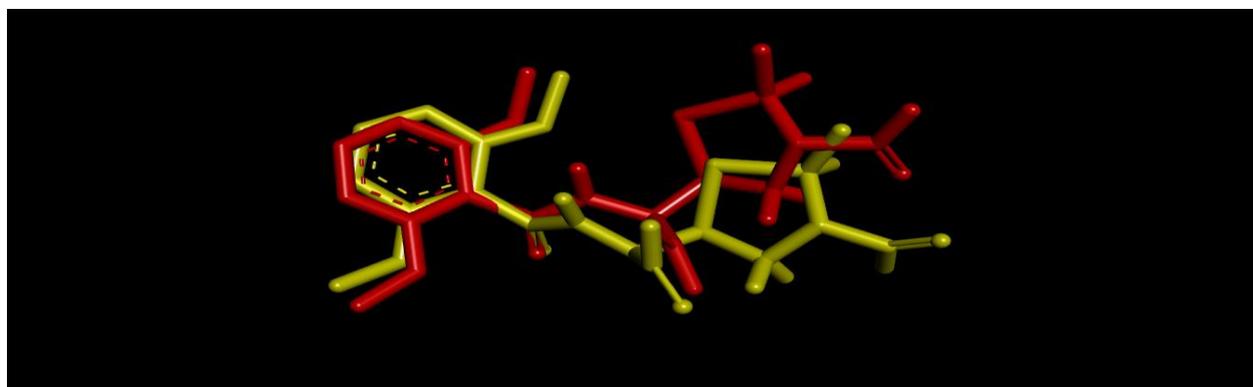


Figure 9. Superposition de la méthicilline simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (rouge). RMSD 1.7 Å. Image générée par *Discovery Studio*.

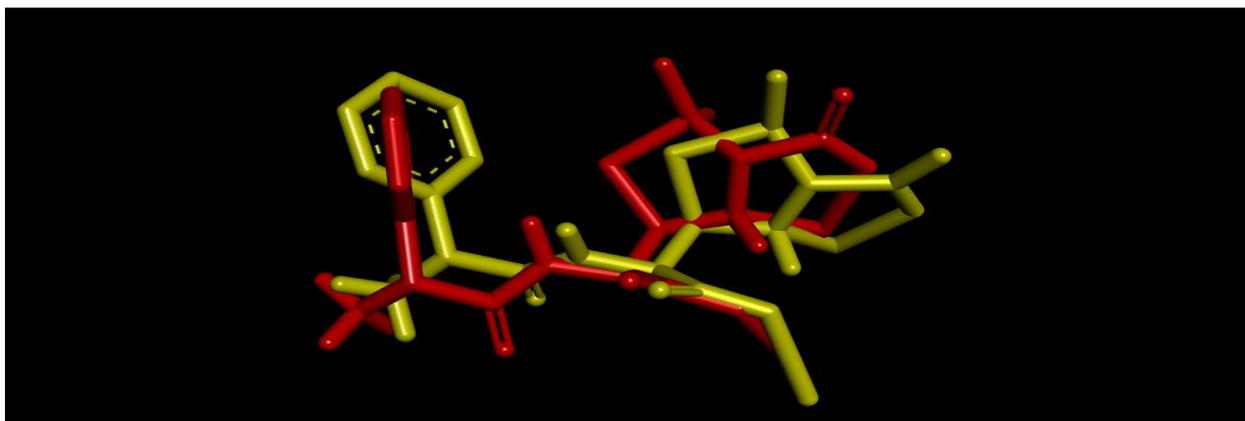


Figure 10. Superposition de l'ampicilline simulé par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (rouge). RMSD 1.2 Å.

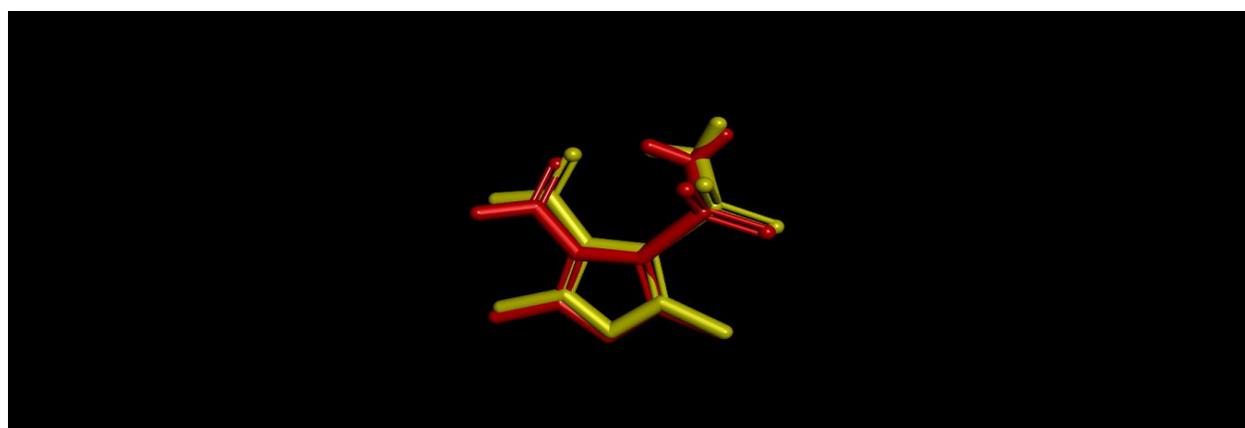


Figure 11. Superposition de l'inhibiteur NO9 simulé par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina. RMSD 0.4 Å.

Le test RMSD et l'analyse visuelle ont démontré que le programme du docking a correctement simulé les structures des ligands placées dans le site actif de la NDM-1 et des conformations pratiquement superposables à celles résolues par cristallographie aux rayons X.

2.2. Docking des différentes molécules sur le récepteur NDM-1 (5ZGE)

a. Identification de l'antibiotique qui se lie avec précision avec NDM-1 (5ZGE)

Une série de 10 antibiotiques β -lactames comprenant différentes sous-familles comme les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et un inhibiteur clinique standard ont été amarrés au récepteur pour trouver le composant présentant l'énergie de liaison moyenne la plus faible.

La pipéracilline s'est mieux comporté que les divers antibiotiques et inhibiteur, puisque l'énergie de liaison observée a été de -7.4 kcal/mol après l'amarrage (Tableau 7). C'est pourquoi

elle a été choisie comme principal filtre en termes d'énergie de liaison pour cribler tous les composés naturels en vue de la sélection finale des ligands.

Tableau 7. Energie moyenne de liaison des antibiotiques et de l'inhibiteur avec la NDM-1 utilisée dans l'étude de docking.

Antibiotique/inhibiteur	ID PubChem	Energie de liaison (kcal/mol)
Ampicilline	6249	-7.4
Aztreonam	5742832	-6.3
Cefepime	5479537	-7
Ceftazidime	5481173	-6.9
Cefuroxime	5479529	-6.7
Doripénem	73303	-7.1
Imipénem	104838	-5.9
Inhibiteur NO9	39870159	-5.4
Meropénem	441130	-6.9
Méthicilline	6087	-7.1
Pipéracilline	43672	-7.4

b. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : pipéracilline'

Le programme *Discovery Studio Visualiser* a permis de définir les interactions qui ont eu lieu entre le site catalytique de la β -lactamase (5ZGE) et la pipéracilline.

Les figures 12, 13 et 14 montrent le mode de liaison et les interactions des résidus de la protéine dans son site actif avec la pipéracilline.

Les résidus histidine (HIS 122), glutamine (GLN 123), acide aspartique (ASP 124), lysine (LYS 211), asparagine (ASN 220) et (HIS 250) ont été impliqués dans la formation de liaisons hydrogène alors que tryptophane (TRP 93) a réalisé une interaction de soufre avec la pipéracilline. Les liaisons formées étaient comprises entre 1.81 et 5.74 Å.

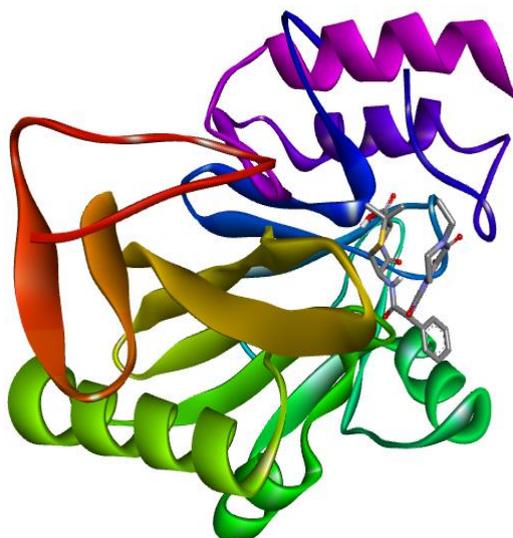


Figure 12. Mode de liaison de la NDM-1 avec la piperacilline amarrée. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : piperacilline. Image générée par *Discovery Studio Visualizer*.

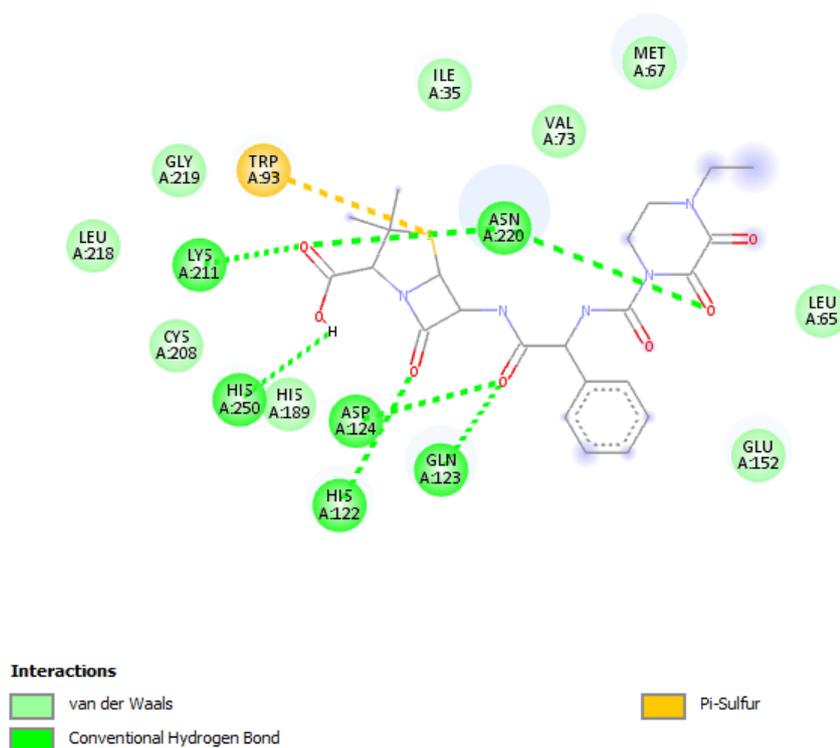


Figure 13. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la piperacilline. Les résidus en vert et en vert clair impliquent les liaisons hydrogènes et de van der Waals respectivement. Le résidu en orange montre la liaison de soufre.

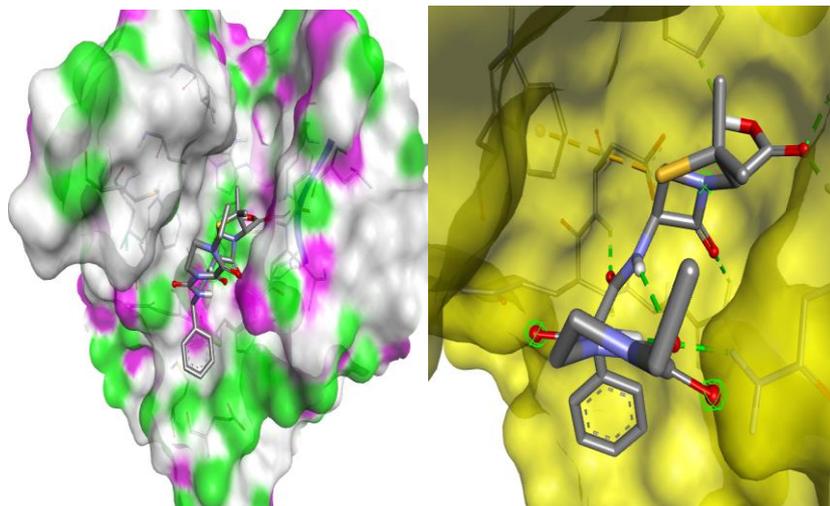


Figure 14. Emplacement de la pipéracilline dans le site catalytique de la bêta-lactamase. Image générée par *Discovery Studio Visualizer*.

c. Amarrage des produits naturels à la NDM-1

Un échantillon de 10 composés naturels a été soumis au docking moléculaire avec la NDM-1 (**5ZGE**). Les résultats obtenus ont montré que la majorité des éléments testés ont manifestés une énergie d'interaction proche ou supérieure à celle du ligand de référence (pipéracilline) (Tableau 8). Notamment, la catéchine-afzelechine et la withaférine A avec des scores excellents (énergie de liaison) de -9.9 et -8.9 kcal/mol respectivement.

La fixation de ces produits dans le site catalytique de la bêta-lactamase n'a fait que renforcer les hypothèses formulées dans le cadre de l'activité inhibitrice potentielle de ces derniers.

Tableau 8. Energie moyenne de liaison des différents produits naturels enregistrée avec la NDM-1 par AutoDock Vina en opposition à la pipéracilline.

Molécule	Affinité (kcal/mol)
Pipéracilline (Antibiotique de référence)	7.4
Catéchine-Afzelechine	-9.9
Withaférine A	-8.9
Diosgénine	-8.7
E-Guggulstérone	-8
Theaflavin Digallate	-7.9
Acide aristolochique	-7.5
Prodelphinidine	-7.1
Bêta-sitostérol	-6.9
Catéchine-Epicatéchine	-6.9
Procyanidine	-6.9

d. Nature des interactions du complexe ‘NDM-1 : catéchine-afzelechine’

En effet, les résidus glycine (GLY 36), HIS 122, ASN 220 et ASP 124 ont été impliqués dans la mise en place des ponts hydrogènes, ASP 212 dans la formation d’une liaison électrostatique, isoleucine (ILE 35) et HIS 250 des liaisons hydrophobiques et enfin, cystéine (CYS 208) une liaison de soufre. Les interactions formées ont été comprise dans un périmètre de 1.24 à 5.38 Å.

Les figures 15, 16 et 17 montrent le mode de liaison et les interactions des résidus de la protéine dans son site actif avec la catéchine-afzelechine.

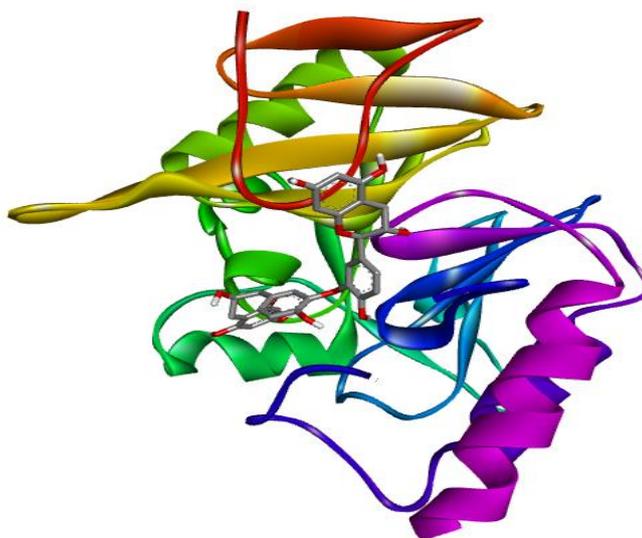


Figure 15. Mode de liaison de la NDM-1 avec la catéchine-afzelechine. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : catéchine-afzelechine.

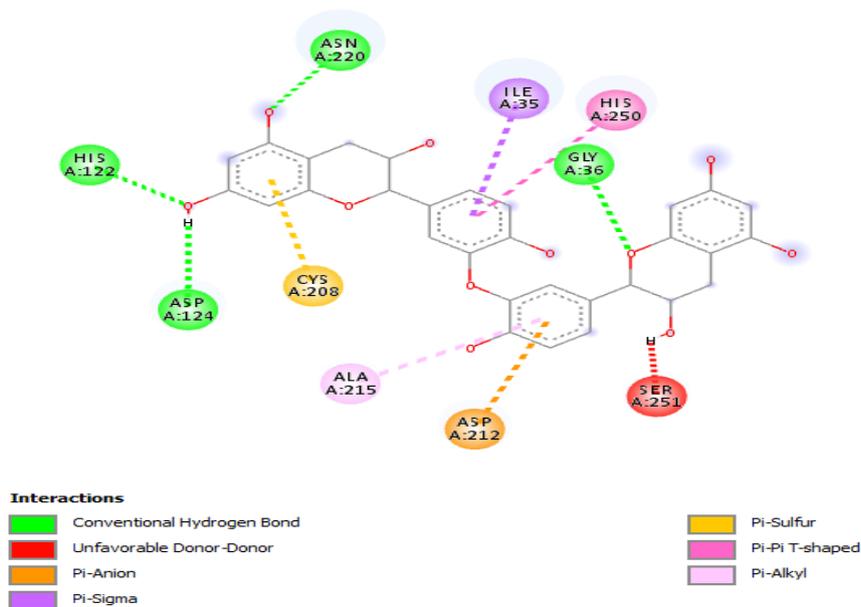


Figure 16. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la catéchine-afzelechine. Les résidus en vert impliquent les liaisons hydrogènes, en jaune la liaison de soufre, en rose et en violet des liaisons hydrophobiques, en orange une liaison électrostatique et en rouge une liaison non-favorable.

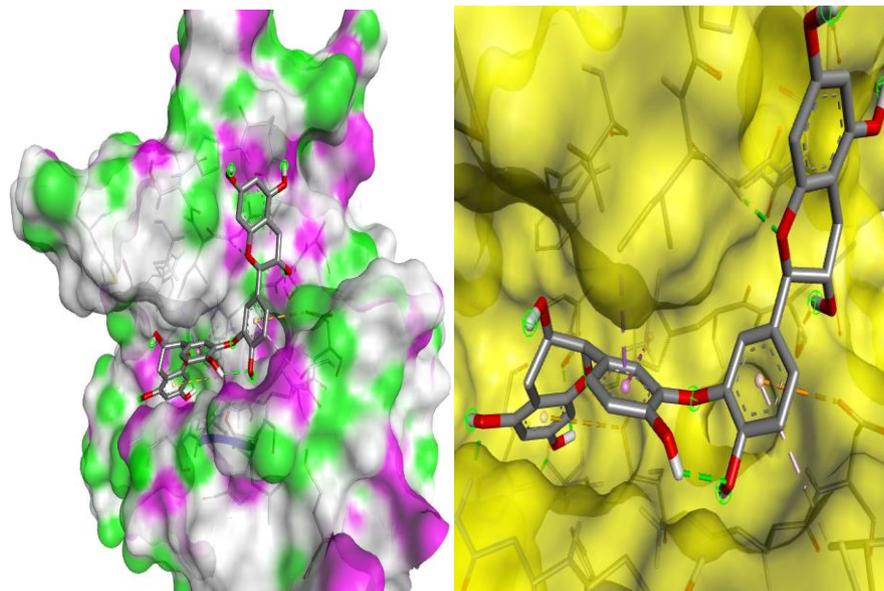


Figure 17. Emplacement de la catéchine-afzelechine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

e. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : diosgénine'

Le résidu acide glutamique (GLU 152) est intervenu dans la formation d'une liaison hydrogène. HIS 250 et ILE 35 ont mis en deux liaisons hydrophobiques. Ces interactions sont comprises dans un périmètre de 4.96 Å.

Les figures 18, 19 et 20 montrent le mode de liaison et les interactions des résidus de la protéine dans son site actif avec la diosgénine.



Figure 18. Mode de liaison de la NDM-1 avec la diosgénine. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : diosgénine.

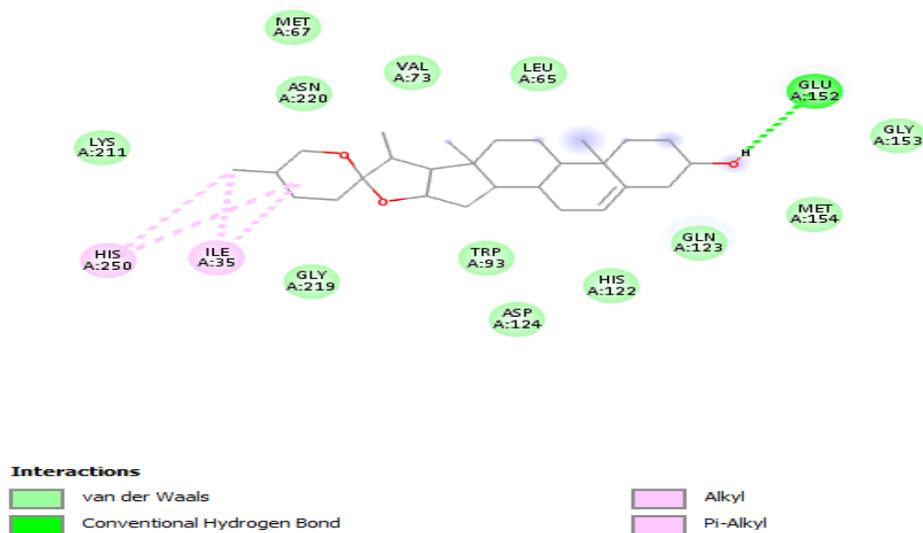


Figure 19. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la diosgénine A. Les résidus en violet et en rose impliquent des liaisons hydrophobiques. Le résidu en vert implique une liaison hydrogène et ceux en vert clair des interactions de van der Waals.

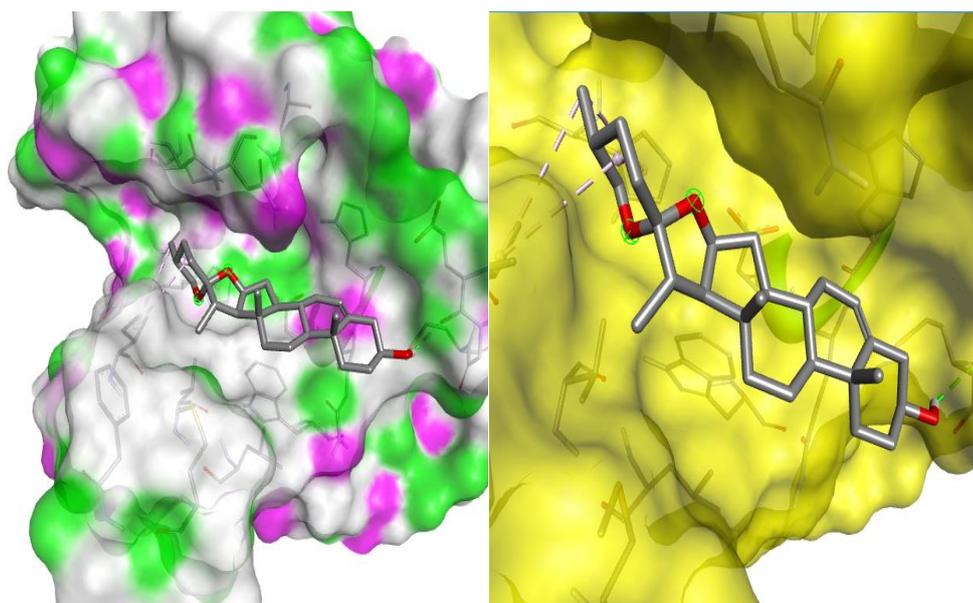


Figure 20. Emplacement de la diosgénine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

f. Nature des interactions du complexe ‘NDM-1 : withaférine A’

Les acides aminés HIS 250 et valine (VAL 73) se sont impliqués dans la formation de deux liaisons hydrophobiques avec le ligand. Ces interactions ont été comprise dans un périmètre de 3.86 à 5.09 Å.

Les figures 21, 22 et 23 montrent le mode d’interaction de la withaférine A dans le site catalytique de la NDM-1.

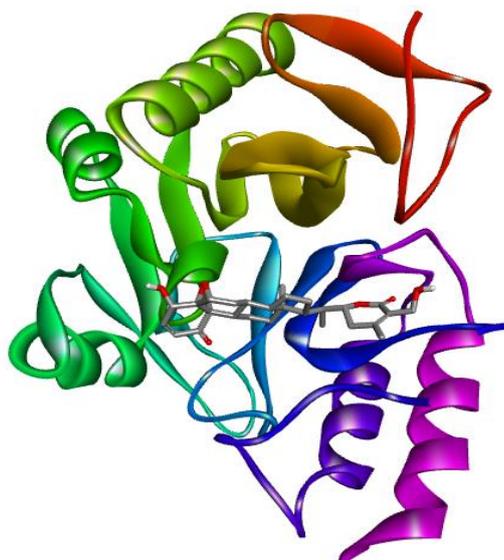


Figure 21. Mode de liaison de la NDM-1 avec la withaférine A. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : withaférine A.

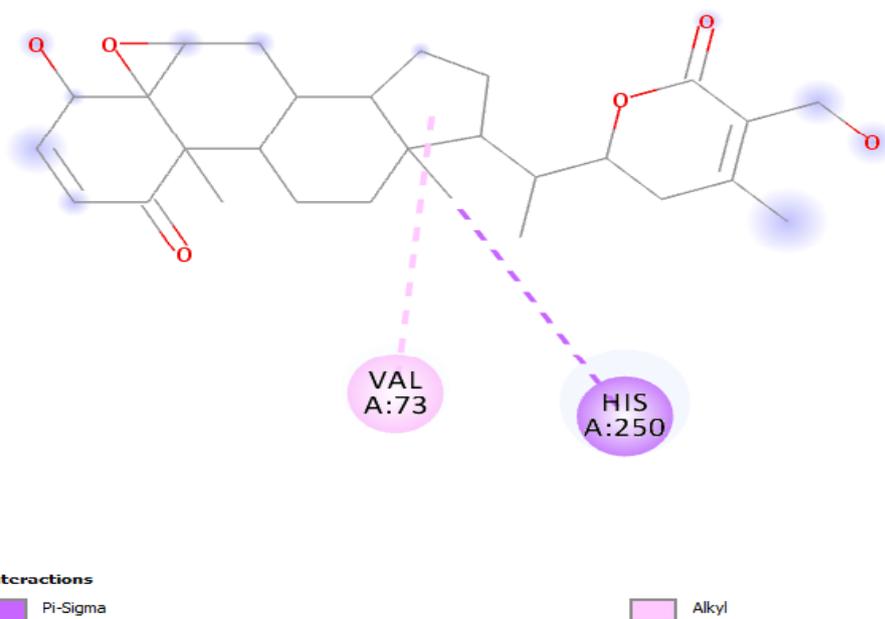


Figure 22. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la withaférine A. Les résidus en violet et en rose impliquent des liaisons hydrophobiques.

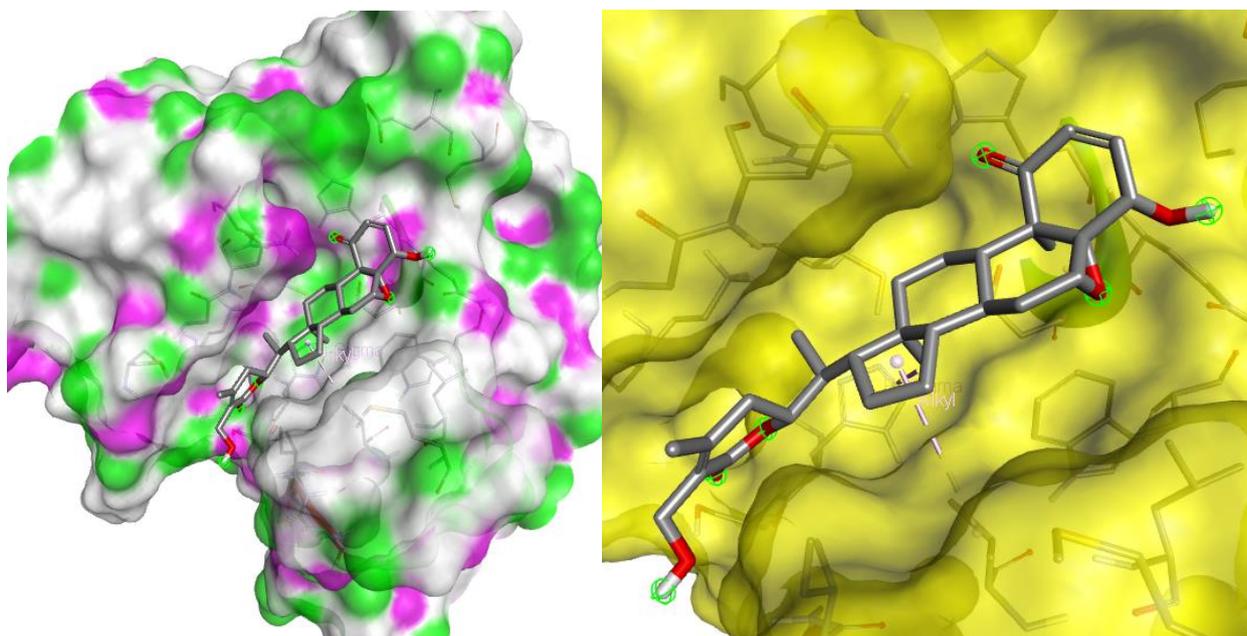


Figure 23. Emplacement de la withaférine A dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

g. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : e-guggulstérone'

Un seul acide aminé a été impliqué dans la formation d'une liaison hydrophobique avec la e-guggulstérone, il s'agit du HIS 250. La distance observée a été de 3.91 Å

Les figures 24, 25 et 26 illustrent le système d'interactions entre le récepteur et le ligand.

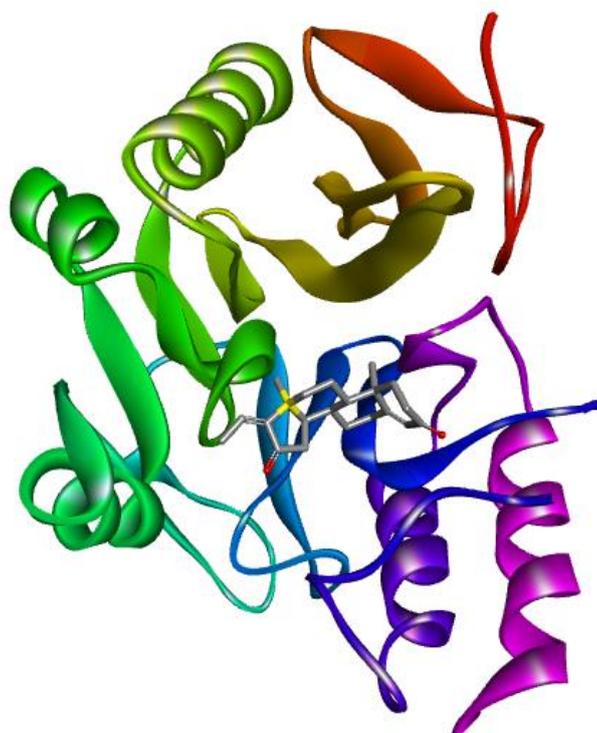


Figure 24. Mode de liaison de la NDM-1 avec la e-guggulstérone. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : e-guggulstérone.

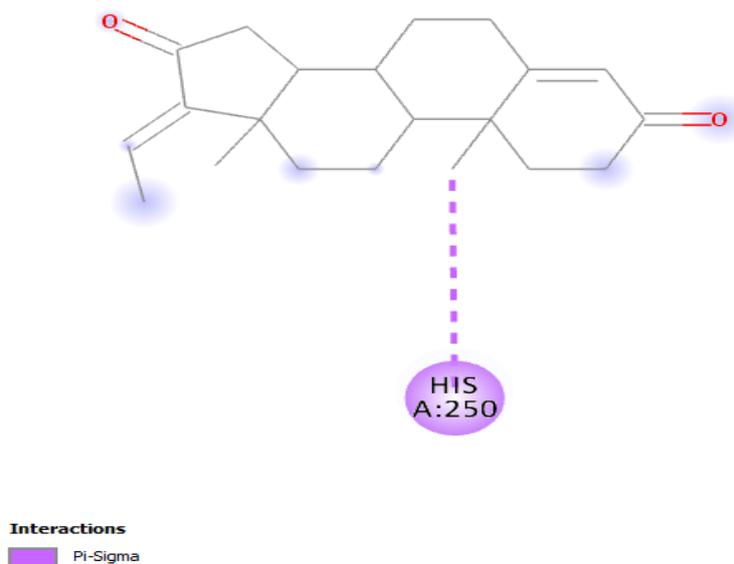


Figure 25. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la e-guggulstérone. Le résidu en violet implique une liaison hydrophobique.

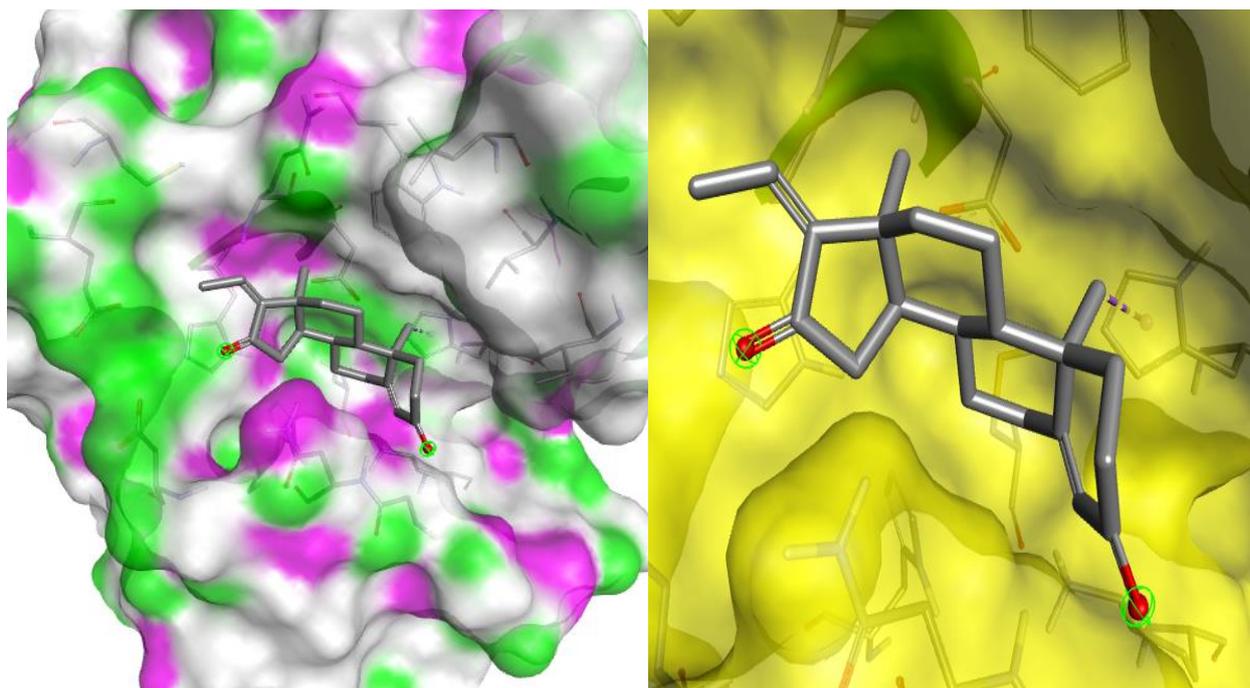


Figure 26. Emplacement de la e-guggulstérone dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

h. Nature des interactions du complexe 'NDM-1 : digallate de théaflavine'

Les résidus thréonine (THR 34), sérine (SER 217), proline (PRO 253), alanine (ALA 252), SER 251 et GLY 36 ont participé à l'élaboration de six liaisons hydrogènes, ALA 215 dans deux liaisons hydrophobiques et ASP 212 dans deux liaisons électrostatiques. Ces liaisons sont comprises dans un périmètre de 2.05 à 5.21 Å.

Les figures 27, 28 et 29 illustrent le mode de liaison de la bêta-lactamase et la digallate de théaflavine.

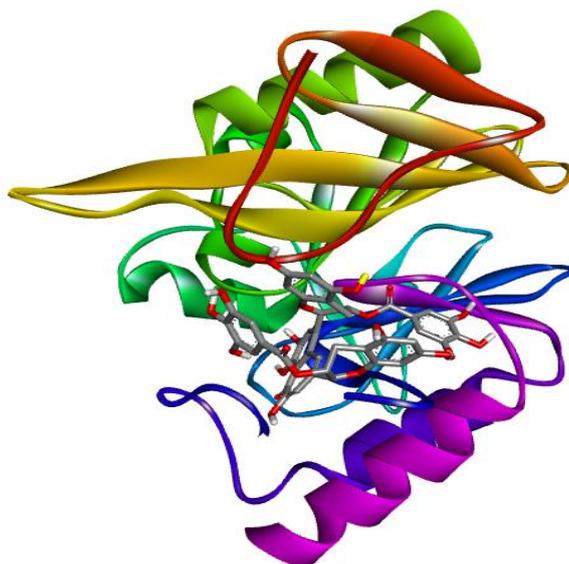


Figure 27. Mode de liaison de la NDM-1 avec la digallate de théaflavine. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : digallate de théaflavine.

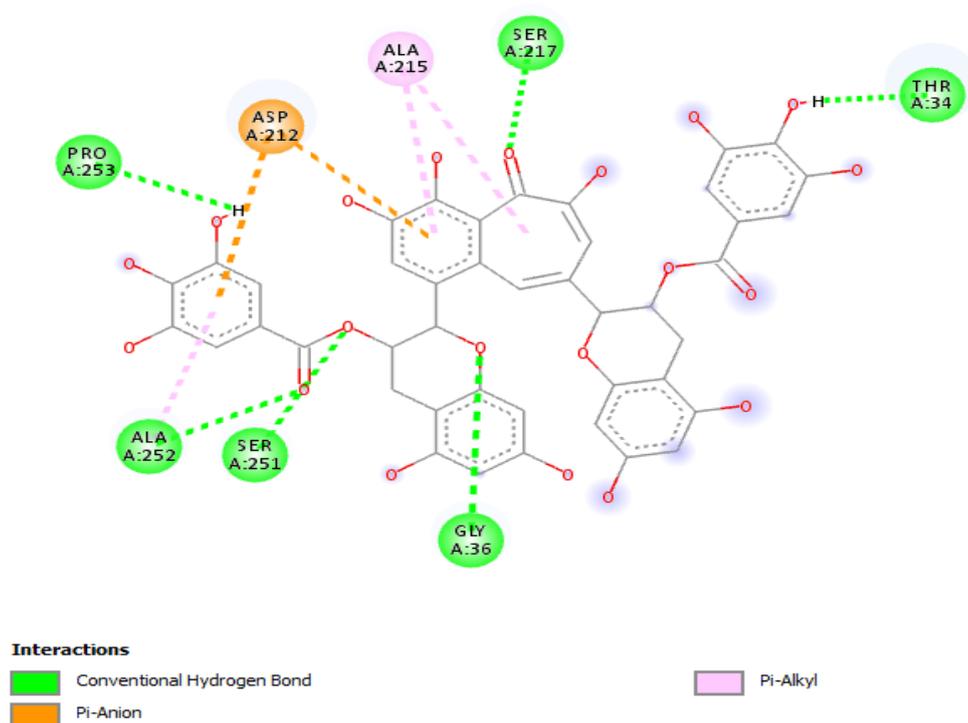


Figure 28. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et la digallate de théaflavine. Les résidus en violet impliquent des liaisons hydrophobiques, en vert des liaisons hydrogènes et en orange des liaisons électrostatiques.

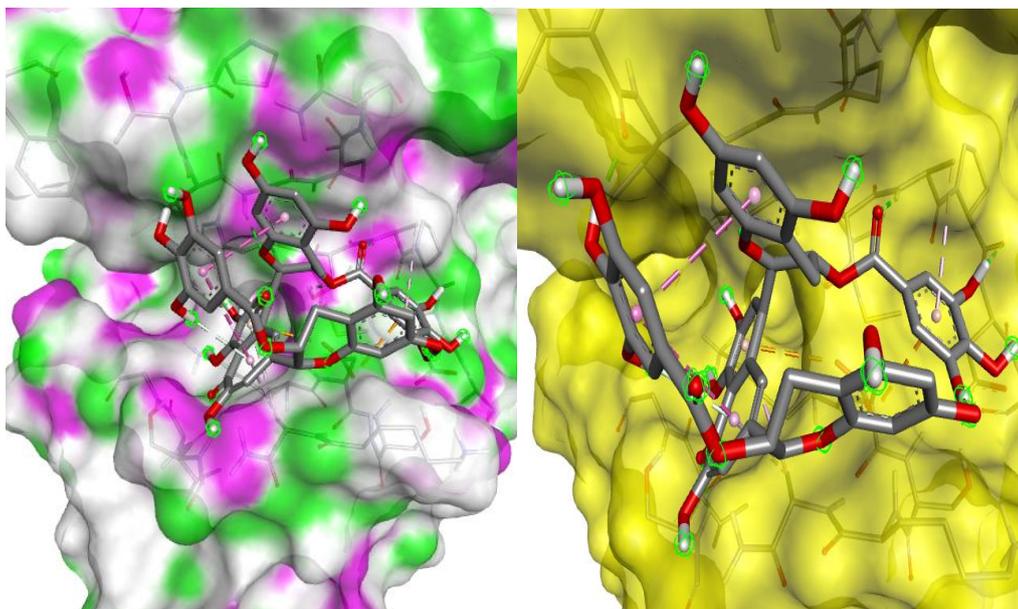


Figure 29. Emplacement de la digallate de théaflavine dans le site actif de la bêta-lactamase.

i. Nature des interactions du complexe ‘NDM-1 : acide aristolochique’

L'acide aminé HIS 122 a participé à la formation de deux liaisons hydrogènes et deux liaisons hydrophobiques. HIS 250, ASN 120 et GLU 152 ont formé trois liaisons hydrogènes, tryptophane TRP 93 deux liaisons hydrophobiques, ASP 124 deux liaisons électrostatiques, VAL 73 et méthionine (MET 154) deux liaisons hydrophobiques. Les liaisons réalisées sont comprises entre 2.11 et 5.34 Å.

Les figures 30, 31 et 32 montrent le mode d'interaction entre la β -lactamase et l'acide aristolochique.



Figure 30. Mode de liaison de la NDM-1 avec l'acide aristolochique. Modèle en ruban : NDM-1, modèle en boule et en bâton : acide aristolochique.

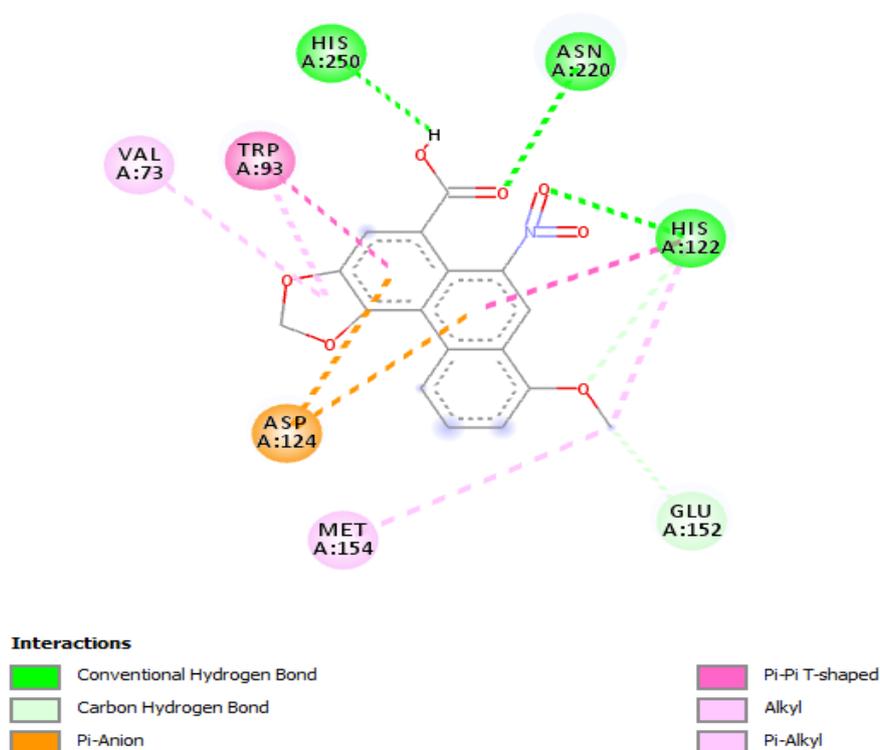


Figure 31. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de NDM-1 et l'acide aristolochique. Les résidus en violet et rose impliquent des liaisons hydrophobiques, en vert et vert clair des liaisons hydrogènes et en orange des liaisons électrostatiques.

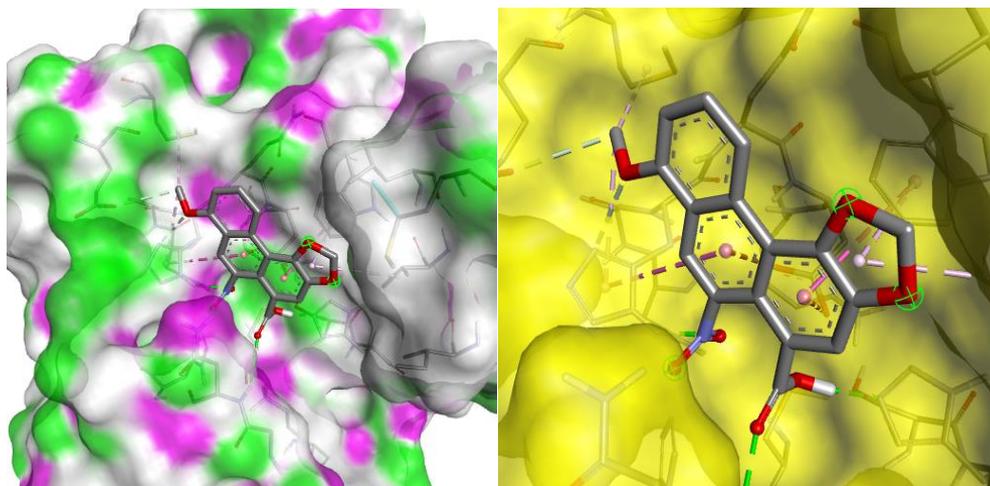


Figure 32. Emplacement de l'acide aristolochique dans le site actif de la bêta-lactamase.

L'interaction de la NDM-1 avec les différents produits naturels sélectionnés et l'antibiotique de référence (pipéracilline) a été résumé dans le tableau 9.

Tableau 9. Tableau récapitulatif des diverses interactions de la New Delhi Métallo-β-lactamase avec l'antibiotique de référence et les composés naturels choisis.

Composant	Liaisons hydrogènes	Liaisons hydrophobiques	Liaisons de soufre	Liaisons électrostatiques	Liaisons de van der Waals	Distance (Å)	Energie de liaison (kcal/mol)
Pipéracilline (Antibiotique de référence)	ASN 220, ASP 124, GLN 123, HIS 122, HIS 250, LYS 211	/	TRP 93	/	CYS 208, GLU 152, GLY 219, HIS 189, ILE 35, LEU 65, LEU 218, MET 67, VAL 73	1.81-5.74	-7.4
Catéchine-afzelechine	ASN 220, ASP 124, GLY 36, HIS 122	HIS 250, ILE 35	CYS 208	ASP 212	/	1.24-5.38	-9.9
Withaférine A	/	HIS 250, VAL 73	/	/	/	3.68-5.09	-8.9
Diosgénine	GLU 152	HIS 250, ILE 35	/	/	ASN 220, ASP 124, GLN 123, GLY 153, GLY 219, HIS 122, LYS 211, MET 67, MET 154, TRP 93, VAL 73	2.36-4.96	-8.7
Digallate de théaflavine	ALA 252, GLY 36, PRO 253, SER 217, SER 251, THR 34	ALA 215	/	ASP 212	/	2.05-5.21	-7.9
Acide aristolochique	ASN 120, GLU 152, HIS 122, HIS 250	HIS 122, MET 153, TRP 93, VAL 73	/	ASP 124	/	2.11-5.34	-7.5
E-guggulstérone	/	HIS 250	/	/	/	3.91	-8

Discussion

Discussion

La pénurie en ressources hydriques, notamment celles destinées à l'usage public, ne cesse de croître en induisant des dégâts monstres sur la faune, la flore et l'être humain. De ce fait, il s'avère indispensable d'adopter de nouvelles stratégies pouvant conduire à la remédiation de ce problème. Le principal objectif du présent travail est d'introduire de nouveaux outils de diagnostic complémentaires et indispensables aux analyses physicochimiques et biologiques ordinaires qui visent à évaluer la qualité des eaux potables. Cette approche est efficace et économiquement accessible en particulier pour les pays en voie de développement. De ce fait, le test *Allium cepa*, qui permet de détecter l'effet des éléments xénobiotiques sur la structure et l'intégrité de l'ADN, constitue un puissant indicateur complémentaire de la qualité des eaux.

L'observation des échantillons d'eau de robinet de la ville de Tiaret a permis de constater une altération cellulaire à travers l'apparition d'anomalies nucléaires et chromosomiques manifestées par la formation de cellules micronucléées et l'apparition des ponts chromosomiques lors de l'anaphase. Toutefois, il est à noter que la taille réduite de l'échantillon testé dans cette étude et le manque de répétitions suffisantes ne permettent pas de dégager des conclusions fermes et tangibles concernant la qualité de l'eau de robinet de la ville de Tiaret. Cependant, la présence de certain nombre d'anomalies à l'échelle cellulaire et chromosomique quoique faible mais suffisant pour adopter ce test parmi les analyses physicochimiques et biologiques ordinaires des eaux destinées à l'usage public.

Ces constatations démontrent une activité mutagène de l'eau de robinet qui ne peut être expliquée que par la présence d'éléments xénobiotiques ayant des effets génotoxiques. En effet, les travaux de Radić et al. (2009) ont montré que les racines d'oignon exposées à l'eau non polluée révèlent une croissance et une morphologie normale contrairement à celles exposées à l'eau polluée qui ont affiché une diminution de longueur, l'apparition de tumeurs, une coloration brunâtre, l'induction de racines sous forme de crochets, et l'inhibition significative de la division cellulaire. De même, Hemachandra et Pathiratne (2015) ont constaté également des anomalies morphologiques des racines d'oignons lors de leur exposition aux échantillons pollués.

En général, les anomalies chromosomiques fréquemment observées dans ce type d'analyse sont les chromosomes adhérents, les ponts anaphasiques, les cassures chromosomiques et les anomalies de chromatine (Hemachandra et Pathiratne, 2015). Vujošević et al. (2007) ont signalé que l'apparition des ponts chromosomiques résulte d'une perturbation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire. Cependant, d'après Feretti et al. (2007), les ponts chromosomiques se

forment lorsque les chromosomes deviennent collants et que leur séparation est retardée ; ils restent alors reliés par des ponts. Les ponts chromosomiques se développent principalement en raison de la non disjonction des chromosomes collants ou de rupture et de jonction lors de la séparation à l'anaphase.

Une autre enquête menée par Matsumoto et al. (2005) afin d'investiguer l'eau contaminée par des effluents industriels a reporté l'enregistrement de fréquences élevées en anomalies chromosomiques et nucléaires dans les racines d'oignon ce qui est dû à la présence de polluants organiques et inorganiques à effets génotoxiques.

De plus, les résultats obtenus par Batista et al. (2016) concernant l'évaluation de la toxicité des eaux de rivières sous l'influence des activités anthropiques consistaient en l'induction de plusieurs types d'altérations chez les racines d'oignons notamment la réduction de l'indice mitotique et la taille des racines. De plus, l'effet mutagène s'est manifesté par une augmentation considérable des aberrations chromosomiques, l'induction de micronoyaux et de cellules binucléés. Des résultats qui se sont avérés très cohérents mettant en relation la pollution urbaine et l'augmentation des dommages causés à l'ADN.

Ces évidences ne peuvent que confirmer l'efficacité du test *Allium cepa* comme outil très fiable et complémentaire aux analyses physicochimiques et biologiques ordinaires des ressources en eau destinées à l'usage public.

En ce qui concerne l'approche computationnelle, cette démarche ne fait que canaliser le problème pour qu'il sera ensuite bien mené *in vitro* ou *in vivo*. Des efforts intensifs ont été déployés pour introduire les études de la biologie computationnelle afin de réduire ou d'éliminer le coût et le temps tout en permettant de mieux comprendre la nature de l'interaction entre les molécules concernées à l'échelle atomique (Singh et al., 2020).

En effet, la pollution des eaux notamment par les rejets et les effluents hospitaliers chargés d'antibiotiques peut induire la propagation rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques à large spectre constituant ainsi un enjeu de santé publique mondiale. La résistance émergente de certaines bactéries entraîne l'inefficacité d'utilisation des antibiotiques et augmentent ainsi la sévérité des maladies et le coût de leurs soins (Davari et al., 2017).

Les β -lactames sont les antimicrobiens les plus couramment utilisés pour traiter les infections bactériennes. Cependant, la résistance bactérienne a compromis leur efficacité, principalement en raison de la production de l'enzyme β -lactamase (Pereira et al., 2018). Malheureusement, l'activité bêta-lactamase a été trouvée et signalée dans les organismes gram-positifs (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*), gram-négatifs (*Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. et *Klebsiella* spp.) et les organismes anaérobies (espèces

Bactéroides) (Davari et al., 2017). Ainsi, la découverte en Inde de la New Delhi Métallo- β -lactamase dans *Klebsiella pneumoniae* à partir d'un échantillon clinique isolé chez un patient touriste à New Delhi constitue dernièrement un risque majeur pour la santé humaine et il n'existe actuellement aucun traitement clinique contre cette calamité.

La recherche et l'identification de molécules inhibitrices de cette enzyme pouvant restaurer ou améliorer l'efficacité des antibiotiques bêta-lactames disponibles contre les souches exprimant la NDM-1 aurait un impact énorme sur la santé humaine et offrirait des bénéfices socio-économiques considérables. Ce besoin immédiat d'inhibiteurs potentiels a motivé l'âme des scientifiques et des chercheurs à tester une gamme de composés naturels. De ce fait, le docking moléculaire par la biologie computationnelle aide à identifier les classes d'inhibiteurs de la NDM-1 et prédit les interactions non covalentes probables et l'énergie de liaison des molécules actives et le site actif de cette enzyme.

Par conséquent, dans cette étude, parmi les 10 antibiotiques bêta-lactamines et l'inhibiteur standard soumis à l'analyse de docking avec la NDM-1, la pipéracilline présentait l'affinité de liaison maximale (-7.4 kcal/mol). De ce fait, 10 composés naturels non bêta-lactame qui peuvent potentiellement inhiber l'activité de cette enzyme ont été testés. Six d'entre eux ont affiché des meilleurs résultats dans le cadre d'affinité avec la NDM-1 par comparaison à l'antibiotique de référence qui est la pipéracilline. Il s'agit de la catéchine-afzelechine, la withaférine A, la diosgénine, la e-guggulstérone, la digallate de théaflavine et l'acide aristolochique.

Il s'est avéré que la pipéracilline se lie aux résidus de la bêta-lactamase à travers la formation de six ponts hydrogènes, neuf interactions de van der Waals et une liaison de soufre. En outre, quatre liaisons d'hydrogène, une liaison électrostatique, deux liaisons hydrophobiques et une liaison de soufre ont été formées entre les résidus de la NDM-1 et le produit naturel catéchine-afzelechine qui a affiché l'énergie de liaison la plus élevée.

Par ailleurs, la diosgénine s'est distinguée par la mise en place de deux liaisons hydrophobiques, une liaison hydrogène et onze liaisons de van der Waals avec les résidus de la NDM-1. La withaférine A, deuxième en termes d'énergie de liaison la plus élevée, a été sollicité par la formation de deux liaisons hydrophobiques avec les acides aminés de la protéine et la e-guggulstérone par une liaison hydrophobique uniquement. La digallate de théaflavine s'est amarré au site actif de la bêta-lactamase en réalisant six liaisons d'hydrogène et deux liaisons, hydrophobique et ionique. Enfin, l'acide aristolochique s'est fixé par l'intermédiaire de quatre ponts hydrogènes, quatre liaisons hydrophobiques et une liaison électrostatique.

Ces résultats illustrent que certains résidus du site actif de la métallo-bêta-lactamase (ASN 220, ASP 124, GLU 152, GLY 36, HIS 122 et HIS 250) se sont impliqués dans la formation de liaisons hydrogènes aussi bien avec la pipéracilline qu'avec la catéchine-afzelechine, la

diosgénine, la digallate de théaflavine et l'acide aristolochique. Les liaisons hydrophobiques ont impliqué l'intervention des résidus HIS 250 avec la catéchine-afzelechine, la diosgénine, la withaférine A et la guggulstérone, l'acide aminé ILE 35 avec la catéchine-afzelechine et la diosgénine et VAL 73 avec la withaférine A et l'acide aristolochique. Les liaisons ioniques ont été partagé entre le résidu ASP 212 de la protéine et les deux composés naturels, la catéchine afzelechine et la digallate de théaflavine.

Les résidus ASN 220, CYS 208, HIS 122, HIS189, HIS 250 et LYS 211 de la NDM-1 sont signalés comme étant conservés dans des métallo- β -lactamases et jouent un rôle crucial dans la reconnaissance du substrat (Rahman et Khan, 2019).

L'analyse du docking a aussi révélé l'implication des interactions de van der Waals entre la pipéracilline et la diosgénine avec les résidus MET 67, GLY 219, LEU 65 et VAL 73. On a aussi pu apercevoir l'intervention de l'interaction de van der Waals entre la diosgénine et ASP 124 de la NDM-1. Des résultats qui coïncident avec ceux de Rahman et Khan (2019) qui ont pu faire la même constatation et qui suggèrent aussi que les résidus hydrophobes LEU 65, MET 67, PHE 70 et VAL 73 interagissent avec les constituants hydrophobes du substrat et participent à la reconnaissance de la liaison à ce dernier. Selon Salari-jazi (2020), les points chauds des acides aminés qui pourraient être utilisés plus efficacement avec les molécules configurées contre le site de liaison de la NDM-1 sont SER217, SER251, ASN 220, ASP 124, HIS 250, LYS 211 et ILE 35.

Les molécules naturelles testées dans la présente étude ont montré des résultats *in silico* très intéressants dans le cadre de leur potentielle activité inhibitrice de la NDM-1 et il est nécessaire de promouvoir leur utilisation par la meilleure façon possible.

En effet, la catéchine est un composé de la famille des flavonoïdes de la sous-classe des flavanols connue également sous le nom de catéchol. Ce tanin est un composé allélopathique initialement découvert dans les fruits de l'acacia de cajou (*Acacia catechu*) de la famille des fabacées et *Periploca aphylla* de la famille des apocynacées. La catéchine et ses nombreux isomères sont de puissants antioxydants qui aident à prévenir les maladies inflammatoires et coronariennes et ils sont également considérés comme antibactériens (Bais et al., 2002).

Cependant, la diosgénine, un stéroïde sapogénine, est le produit de l'hydrolyse par les acides, les bases fortes ou les enzymes des saponines. On la trouve dans une variété de plantes dont les graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*), les racines d'igname sauvage (*Dioscorea villosa*, *Dioscorea polygonoides* et *Dioscorea zingiberensis*), *Solanum xanthocarpum*, *Solanum incanum* *Lloydia* et *Costus speciosus*. La diosgénine aurait diverses propriétés, telles qu'un effet stabilisateur de la membrane myocardique hypocholestérolémique, un potentiel anticancéreux et une activité antioxydante (Rajalingam et al., 2013).

Outre ces molécules, la withaférine A est une lactone stéroïdienne dérivée des *Acnistus arborescens* et notamment de *Withania somnifera* (ginseng indien). Les deux plantes appartiennent à la famille des solanacées. *Withania somnifera* est une plante médicinale ayurvédique qui possède une activité anticancéreuse (Hahm et Singh, 2013). La guggulstérone, est aussi un stérol actif extrait de la plante *Commiphora mukul* qui est utilisé pour traiter divers troubles chez l'homme, notamment la dyslipidémie, l'obésité et l'inflammation (Burris et al., 2005). De plus, la digallate de théaflavine est un composé antioxydant appartenant aux phénols naturels, présent dans le thé noir *Camellia sinensis L.* et le gingembre *Zingiber officinale* (Lin et al., 2000). Enfin, l'acide aristolochique est un composé naturel que l'on trouve dans le monde entier dans les végétaux appartenant à la famille des aristolochiacées. Il a été testé dans un certain nombre de traitements contre les troubles inflammatoires, principalement en médecine chinoise et populaire. Toutefois, son utilisation suscite des inquiétudes car l'acide aristolochique est à la fois cancérigène et néphrotoxique (Priestap et al., 2011).

Les études réservées à l'identification des produits naturels qui pourraient inhiber la New Delhi Métallo-bêta-lactamase ont réussi à promouvoir la réalité de ces molécules notamment la capacité des molécules actives à contrer les effets indésirables de nombreux agents pathogènes. Des preuves qui élucident la nécessité de l'examen de ces composés afin de confirmer leur potentiel inhibiteur et d'élaborer des stratégies pour leur extraction et utilisation comme agents antibactériens.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La présente étude a pour but d'élucider l'importance de l'approche moléculaire et cellulaire comme technique de diagnostic moléculaire pour le contrôle de la qualité des eaux destinées à la consommation humaine d'une part, et comme outil de screening moléculaire *in silico* pour résoudre certains problèmes associés à la pollution hydrique notamment l'émergence de l'antibiorésistance bactérienne suite à l'exposition fréquente aux antibiotiques variés qui se trouvent dans les rejets hospitaliers et les eaux usées.

Au terme des résultats obtenus, l'efficacité du test d'*Allium cepa* doit permettre son incorporation comme outil de diagnostic simple et pratique en particulier dans les pays en développement pour la surveillance de la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

En revanche, l'analyse *in silico* a pu mettre en évidence la faisabilité de la recherche et d'emploi des molécules actives d'origine naturelle pour contrebalancer l'antibiorésistance bactérienne. Il s'est avéré que la pipéracilline est l'antibiotique bêta-lactamine qui présente une affinité de liaison maximale à la New Delhi Métallo-bêta-lactamase 1 (NDM-1) par rapport aux autres neufs antibiotiques reconnus. Cependant, parmi les dix biomolécules naturelles testées qui pourraient exercer une potentielle inhibition de l'enzyme NDM-1, la catéchine-afzelechine, la withaférine A, la diosgénine, la e-guggulstérone, la digallate de théaflavine et l'acide aristolochique ont présenté de meilleures affinités avec le site actif de NDM-1 par rapport à l'antibiotique de référence la pipéracilline.

De plus, certains résidus du site actif de la métallo-bêta-lactamase à savoir ASN 220, ASP 124, GLU 152, GLY 36, HIS 122 et HIS 250 se sont impliqués dans la formation de liaisons hydrogènes aussi bien avec l'antibiotique de référence 'pipéracilline' qu'avec les biomolécules retenues dans cette étude.

Les molécules actives identifiées dans la présente étude ont montré des résultats *in silico* très intéressants comme de potentiels inhibiteurs de la NDM-1 et par conséquent de l'antibiorésistance. Il est donc envisagé que les inhibiteurs identifiés serviront de meilleur point de départ pour les études expérimentales visant la conception et la découverte des inhibiteurs de NDM-1. De plus, des expériences *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires afin de confirmer le potentiel inhibiteur de ces molécules afin de les promouvoir comme agents antibactériens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Afzaal, M., Mirza, S.A., Arooj, T., Almas, M., Ahmed, S., 2020. Antimicrobial and antibiotic resistance genes in the environment in *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes*. Springer Nature Switzerland, pp 51-73.
2. Ayad, W., 2017. Evaluation de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux souterraines : cas des puits de la région d'El-Harrouch (Wilaya de Skikda). Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
3. Bais, H.P., Walker, T.S., Stermitz, F.R., Hufbauer, R.A., Vivanco, J.M., 2002. Enantiomeric dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (\pm)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed in *Plant Physiology*, volume 128. American Society of Plant Biologists, 1173-1179.
4. Banaganapalli, B., Morad, F.A., Khan, M., Kumar, C.S., Elango, R., Awan, Z., Shaik, N.A., 2019. Molecular docking in *Essentials of Bioinformatics*, volume 1. Springer Nature Switzerland, pp 335-353.
5. Batista, N.J.C., Cavalcante, A.A.D.C.M., De Oliveira, M.G., Medeiros, E.C.N., Machado, J.L., Evangelista, S.R., Dias, J.F., Dos Santos, C.E.I., Duarte, A., Da Silva, F.R., Da Silva, J., 2016. *Chemosphere*, 164, 134-141.
6. Beltifa, A., Feriani, A., Alibi, S., Loco, J.V., Verschaeve, L., Anthonissen, R., Mansour, H.B., 2019. Genotoxicity assessment of the hospital wastewaters in Tunisia. *Journal of the environmental toxicology and analytical research*, 1: 104.
7. Benadela, L., Bekkoussa, B., 2017. Application des méthodes d'analyses statistiques multivariées à l'étude de la minéralisation des eaux du système aquifère de la plaine de Ghriess (Nord-ouest Algérien). *Larhyss journal*, 29, 75-94.
8. Beoletto, V.G., Oliva, M.D.M., Marioli, J.M., Carezzano, M.E., Demo, M.S., 2016. Antimicrobial natural products against bacterial biofilms in *Antibiotic Resistance*. Elsevier inc., pp 291-307.
9. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Research*, 28, 235-242.
10. BIOVIA, Dassault Systèmes, *Discovery Studio Visualizer*, (v20. 1.0. 19295), San Diego: Dassault Systèmes, 2020.
11. Borah, P., Kumar, M., Devi, P., 2020. Types of inorganic pollutants: metals/metalloids, acids and organic forms in *Inorganic pollutants in water*. Elsevier inc., 17-31.

12. Chaden, M.H., 2014. Evaluation de la qualité de l'eau du bassin supérieur de la rivière du Litani, Liban : approche hydrogéochimique. Thèse de doctorat. Université de Lorraine, Nancy, France.
13. Davari, K., Nowroozi, J., Hosseini, F., Sepahy, A.A., Mirzaie, S., 2017. Structure-based virtual screening to identify the beta-lactamase CTX-M-9 inhibitors: An *in silico* effort to overcome antibiotic resistance in *E. coli*. Computational Biology and Chemistry.
14. Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Yokota, H., Cho, K.H., 2013. Encyclopedia of Systems Biology. Springer science+Business Media LLC, India.
15. Dugan, P.R., 1972. Biochemical ecology of water pollution. Plenum Press, New York.
16. Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Ceretti, E., Moretti, M., Monarca, S., 2007. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. Food Additives and Contaminants, 24:6, 561-572.
17. Fiskesjö, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. Hereditas, 102, 99-112.
18. Goncharuk, V.V., 2014. Drinking Water. Springer International Publishing, Switzerland.
19. Hahm, E., Singh, S.V., 2012. Withaferin A-induced apoptosis in human breast cancer cells is associated with suppression of inhibitor of apoptosis family protein expression. Cancer Letters.
20. Jagstap, U.B., 2020. Bioremediation strategies for removing antibiotics from the environment in Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes. Springer Nature Switzerland, pp 319-334.
21. Jufer, H., Reilly, L., Mojica, E.E., 2018. Antibiotics pollution in soil and water: Potential ecological and human health issues in Encyclopedia of Environmental Health, 2nd edition. Elsevier Inc.
22. Kallen, A.N., 2020. Basic genetics: mitosis, meiosis, chromosomes, DNA, RNA and beyond in Human Reproductive Genetics. Elsevier inc., 3-16.
23. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E.E., 2018. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. Nucleic Acid Research.
24. Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 682, pp 71-81.

25. Li, F., Zhou, T., 2020. Effects of objective and subjective environmental pollution on well-being in urban China: A structural equation model approach. *Social Science & Medicine*, 249.
26. Lin, J.K., Chen, P., Ho, C., Lin-Shiau, S., 2000. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48, 2736-2743.
27. Liu, Z., Liu, Y., Zeng, G., Shao, B., Chen, M., Li, Z., Jiang, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Zhong, H., 2018. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. *Chemosphere*.
28. Lopez, S.L., Aiassa, D., Benitez-Leite, S., Lajmanovich, R., Manas, F., Poletta, G., Sanchez, N., Simoniello, M.F., Carrasco, A.E., 2012. Pesticides used in South American GMO-based agriculture: A review of their effects on humans and animal models in *Advances in Molecular Toxicology*, volume 6. Elsevier B. V., pp 41-75.
29. Lu, F., Astruc, D., 2020. Nanocatalysts and other nanomaterials for water remediation from organic pollutants. *Coordination Chemistry Reviews*, 408, 213180.
30. Martelli, G., Giacomini, D., 2018. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
31. Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malaguitti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A., 2005. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 1, 148-158.
32. Nikinmaa, M., 2014. *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Elsevier inc., UK, USA.
33. Pathiratne, A., Hemachandra, C.K., 2015. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 1-12.
34. Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J., 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications of the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1665-1677.
35. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 13, 1605-12.

36. Priestap, H.A., Torres, M.C., Rieger, R.A., Dickman, K.G., Freshwater, T., Taft, D.R., Barbieri, M.A., Iden, C.R., 2011. Aristolochic acid I metabolism in the isolated perfused rat kidney. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 130-139.
37. Qadri, H., Bhat, R.A., Mehmood, M.A., Dar, G.H., 2020. Fresh water pollution dynamics and remediation. Springer Nature Singapore Pte Ltd.
38. Radić, S., Stipanicev, D., Vujcic, V., Rajcic, M.M., Sirac, S., Pevalek-Kozlina, B., 2009. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment*, 408, 1228-1233.
39. Rahman, M., Khan, M.K.A., 2019. *In silico* based unraveling of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) inhibitors from natural compounds: a molecular docking and molecular dynamics simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.
40. Rajalingam, K., Sugunadevi, G., Vijayaanand, M.A., Sathiyapriya, J., Sivakumar, K., Suresh, K., 2013. Anticlastogenic of diosgenin on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene treated experimental animals. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(2), 77-85.
41. Riaz, L., Yang, Q., Sikandar, A., Safeer, R., Anjum, M., Mahmood, T., Rehman, M.S.U., Rashid, A., Yuan, W., 2020. Antibiotics use in hospitals and their presence in the associated wastes in Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes. Springer Nature Switzerland, pp 27-43.
42. Roy, B., Krishnan, S.P., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2019. Toxic effects of engineered nanoparticles (metal/metal oxides) on plants using *Allium cepa* as a model system in *Comprehensive Analytical Chemistry*, volume 84. Elsevier B. V., pp 125-143.
43. Salari-Jazi, A., Mahnam, K., Sadeghi, P., Damavandi, M.S., Faghri, J., 2020. Discovery of New Delhi Metallo- β -Lactamase-1 (NDM-1) inhibitors from natural compounds: *In silico* based methods. Research Square.
44. Schames, J.R., Henchman, R.H., Siegel, J.S., Sotriffer, C.A., Ni, H., McCammon, J.A., 2004. Discovery of a novel binding trench in HIV integrase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 1879-1881.
45. Singh, A.K., Chowdhary, P., Raj, A., 2020. *In silico* bioremediation strategies for removal of environmental pollutants released from paper mills using bacterial ligninolytic enzymes in *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. Elsevier inc., pp 249-285.
46. Singh, K.P., Imam, J., Shukla, P., 2014. *In silico* approach in bioremediation in *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier inc., pp 421-433.
47. Soltani, A.A., Oukil, A., Boutaghane, H., Bermad, A., Boulassel, M.R., 2020. A new methodology for assessing water quality, based on data envelopment analysis: Application to Algerian dams. *Ecological Indicators*, 121, 106952.

48. Stankovic, S., Stankovic, A.R., 2013. Bioindicators of toxic metals in Green Materials for Energy, Products and Depollution. Springer science+Business Media Dordecht, 151-228.
49. Stice, S.A., Beedanagari, S.R., Vulimiri, S.V., Bhatia, S.P., Mahadevan, B., 2019. Genotoxicity biomarkers: molecular basis of genetic variability and susceptibility in Biomarkers in Toxicology, 2nd edition. Elsevier inc., pp 807-821.
50. Tennant, D., 1997. Food Chemical Risk Analysis. Springer US.
51. Trott, O., Olson, A.J., 2009. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Wiley Periodicals, inc., pp 455-461.
52. Vujosevic, M., Anelkovic, S., Savic, G., Blagojevic, J., 2007. Genotoxicity screening of the river Rasina in Serbia using the *Allium* anaphase-telophase test. Environmental Monitoring and Assessment, 147, 75-81.
53. Wang, X., Yang, Y., Gao, Y., Niu, X., 2020. Discovery of the novel inhibitor against New Delhi Metallo- β -Lactamase based on virtual screening and molecular modeling. International Journal of Molecular Sciences, 21, 3567.
54. Zeng, X., Zhang, P., He, W., Qin, C., Chen, S., Tao, L., Wang, Y., Tan, Y., Gao, D., Wang, B., Chen, Z., Chen, W., Jiang, Y.Y., Chen, Y.Z., 2018. NPASS: natural product activity and species source database for natural product research, discovery and tool development. Nucleic Acid Research.
55. Zgheib, S., 2009. Flux et sources des polluants prioritaires dans les eaux urbaines en lien avec l'usage du territoire. Thèse de doctorat. Ecole nationale des ponts et chaussées, Paris, France.