

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique

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 en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

**Domaine:** "Sciences de la Nature et de la Vie"

**Filière :** "Sciences biologiques"

**Spécialité:** "Biotechnologie Microbienne"

Présenté et soutenu par :

- Benchehida Fatima Zohra
- Loumani Kheira
- Maarouf Roumeissa Lilia

## Thème

Caractérisation du polyéthylène glycol en vue de  
l'utiliser autant qu'agent antibactérien

### JURY:

- |                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| - Président : Rahmoune Bilal          | Grade « MCA» |
| - Promoteur: Bensaid Mohamed Ouassini | Grade « MCA» |
| - Co-promoteur: Ali-Nehari Abdelkader | Grade « MCA» |
| - Examineur: Fettouhi Bekhaled        | Grade «MCB»  |

## ***Remerciements :***

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à Dieu qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à notre Promoteur : **Dr. BENSaid M. O**, pour ses conseils, ses encouragements, sa patience, sa compétence, sa gentillesse, ses qualités humaines et scientifiques resteront pour nous un exemple, qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.

Nous sommes constamment impressionnés de constater à quel point il nous a poussé pour atteindre nos buts et d'avoir identifié et stimulé nos potentiels.

Nos remerciements les plus sincères vont également à notre Copromoteur : **Dr. ALINEHARI AEK** Veuillez trouver ici l'expression de nos profonds sentiments de respect pour le soutien que vous n'aviez cessé de nous porter.

Nos remerciements les plus sincères vont également à notre Enseignant: **Dr. YEZLI W** pour l'aide qui nous a porté pour bien mener notre travail.

Nos remerciements vont au président de JURY, Dr. **Rahmoune Bilal** merci de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Nos vifs remerciements s'adressent aussi **Dr. Fetouhi Bekhaled**, qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillance et nous en sommes très honoré.

Grand merci à l'équipe du laboratoire de Microbiologie Mlles **FETEHIA ET Amina** et madame **LEILA**, pour leur gentillesse et serviabilité.

## *Dédicace :*

الى سيدة نساء الكون في عيني التي تركتني في منتصف الطريق ندى روعي وبلسمها لك  
اهدي تخرجي

اليك امي ارفع قبعات الفخر والعز اليك ايتها الروح الطاهرة التي ذهبت بلا عوده رحمتك الله  
وأسكنك فسيح جناته

Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde Mon père Brahim et ma mère la défunte, que Dieu lui fasse miséricorde, Tourkia Nacera.

Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.....

A mes très chers frères Hichem, BelKacem, Sidahmend, Kamel et Zakaria pour leurs aide et leur soutien. ....

A mes chères tentes hbiba Rachida, hbiba Nawel et hbiba fatiha merci pour tous ce que vous me donnez .....

A toute ma famille et tous mes amis qui occupent une place dans mon cœur Sissi, Amira, Ibtihel, Racha, Ines, Wahid, Kadi, Ilyes, Amine Acef, Sinda, Sabah, et Fatima Zohra Benchehida, Roumeissa amie avant d'être trinôme et leurs familles .....

Merci pour les très bons moments qu'on avait partagés ensemble. Puisse dieu vous donne santé, bonheur courage et surtout réussite.

*Loumani kheira*

## Dédicace :

Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde mes parents

Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.....

A mes très chers frères et sœur pour leur aide et leur soutien. ....

A toute ma famille et tous mes amis qui occupent une place dans mon cœur aicha serine aicha maya houda assia nihed esma racha ibtihel sarrah sabrine serine et loumani kheira , amie avant d'être trinôme et sa famille.....

Merci pour les très bons moments qu'on avait partagés ensemble. Puisse dieu vous donne santé, bonheur courage et surtout réussite

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION.....	1
<b><u>CHAPITRE I : MATÉRIEL &amp; MÉTHODES</u></b>	
I.1-Objectifs du travail.....	4
I.2- Lieu et période du travail.....	4
I.3-Matériel utilisées.....	4
I.2- Lieu et période du travail.....	4
I.3.1.A.Standardisation de l'inoculum bactérien.....	4
I.3.1.B. Milieux de culture.....	5
I.3.1.C.Préparation du bouillon MH.....	5
I.3.1.D .Stérilisation de MH gélosé.....	6
1.3.2. Préparation de la solution PEG 400.....	6
I.3.3. Produits et appareillage.....	7
I.4- Méthodes.....	9
I.4.1.Caractérisation par spectroscopie infrarouge et Raman du PEG-3400.....	9
I.4.2- Protocole expérimental.....	10
I.4.2.Description du protocole.....	12
I.4.2.1:Détermination in-vitro de l'activité antibactérienne d'antibiotique sur les souches bactériennes.....	12
I.4.2.1.1:Détermination la CMI pour les deux souches bactérienne.....	12
<i>I.4.2.1.A.Préparation des dilutions de l'antibiotique.....</i>	12
<i>I.4.2.2Détermination la CMB pour les deux souches bactérienne.....</i>	13
I.4.3.Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antibactérienne du PEG 3400 sur les souches bactériennes.....	13
I.4.3.1.Estimation préliminaire du PEG par méthode de diffusion où milieux solide.....	13
I.4.3.2-Préparation des dilutions du PEG 3400.....	13
I.5.Détermination in-vitro effet synergique du PEG/AB sur les souches bactériennes.....	14

I.5.2.Détermination in-vitro la CMB de PEG/AB pour les souches bactériennes.....	15
<b><u>CHAPITRE II : RÉSULTATS &amp; DISCUSSION</u></b>	
II.1.Caractérisation spectroscopique du PEG-3400.....	16
II.1.1.Caractérisation infrarouge et Raman.....	16
II.2.Détermination <i>in vitro</i> de la CMI de l'antibiotique sur les souches bactériennes.....	18
II.2.1 : Pour souche <i>E.C.</i> .....	18
II.2.3. Pour souche <i>S.A.</i> .....	19
II.4. Détermination de la CMB pour les deux souches bactérienne.....	20
II.4.1 : Pour <i>E.C.</i> .....	20
II.4.2 : Pour <i>S.A.</i> .....	21
II.5 .Détermination <i>in vitro</i> de la CMI du PEG sur les souches bactériennes.....	21
II.5 .1 .Estimation préliminaire de l'effet du PEG sur les souches bactériennes par la méthode de diffusion.....	22
II.5.2 Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antibactérienne du PEG sur les souches bactériennes.....	22
<i>II.5.3. Pour E.C / S.A.</i> .....	22
II.6. Evaluation de l'effet synergique du composé (ABG/PEG-3400).....	23
II.6.1.: L'estimation de l'effet antibactérien du conjugué (PEG-3400/ABG).....	23
II.6.2.: l'examen en milieu solide des souches bactériennes sous l'effet du conjugué (PEG-3400/ABG).....	23
II.7- spectrophotomètre.....	24
II.7.1- PEG-3400.....	24
II.7.2 - Pour les dilutions d'antibiotique.....	25
II.7.3 Pour l'effet synergique PEG/ABG.....	26
Conclusion.....	32
Références bibliographiques.....	33
Annexe.....	36

## Liste des Tableaux

<b>Tableau n° 01 :</b>	Appareillage et produits utilisés.....	08
<b>Tableau n° 02 :</b>	Différentes fractions molaires d'antibiotique et PEG3400.....	14
<b>Tableau n° 03 :</b>	Attribution des bandes d'absorption infrarouges du spectre du PEG-3400.....	17

## Liste des Figures

<b>Figure n° 01 :</b>	Culture des souches utilisées dans une boîte de pétri (a) <i>E.C</i> et (b) <i>S.A</i> .....	05
<b>Figure n° 02 :</b>	Milieu de culture Muller Hinton (a) en gélose et (b) en bouillon.....	06
<b>Figure n° 03 :</b>	PEG-3400 et gentamicine 80mg/2ml.....	07
<b>Figure n° 04 :</b>	Structure chimique du polyéthylène glycol 3400.....	07
<b>Figure n° 05 :</b>	Structure chimique de la Gentamicine.....	08
<b>Figure n° 06 :</b>	Schéma du protocole expérimental adopté lors de cette étude.....	11
<b>Figure n° 07 :</b>	Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FTIR) du PEG-3400.....	16
<b>Figure n° 08:</b>	Caractérisation par spectroscopie Raman du PEG- 3400.....	17
<b>Figure n° 09 :</b>	Détermination la CMI de l'ABG vis-à-vis <i>E.C</i> .....	18
<b>Figure n° 10 :</b>	Détermination la CMI de l'ABG vis à vis <i>S.A</i> .....	19
<b>Figure n° 11 :</b>	Détermination la CMB de l'ABG vis à vis <i>E.C</i> .....	20
<b>Figure n° 12:</b>	Détermination la CMB de l'ABG vis à vis <i>S.A</i> .....	20
<b>Figure n° 13 :</b>	Test préliminaire par la méthode de diffusion du PEG vis à vis la croissance bactérienne, (a) <i>E.C</i> , (b) <i>S.A</i> .....	21
<b>Figure n° 14 :</b>	Détermination de la CMI du PEG vis à vis <i>S.A</i> .....	22

<b>Figure n°15 :</b>	Détermination de la CMI du PEG vis à vis <i>E.C</i> .....	22
<b>Figure n°16</b>	Evaluation de l'effet synergique (PEG/antibiotique) sur milieu liquide pour les deux souches bactériennes..	23
<b>Figure n°17</b>	Evaluation de l'effet synergique du conjugué (PEG/antibiotique) sur milieu solide vis-à-vis <i>E.C</i> ...	23
<b>Figure n°18</b>	Evaluation de l'effet synergique du conjugué (PEG/antibiotique) sur milieu solide vis-à-vis <i>S.A</i> .....	24
<b>Figure n°19</b>	Evolution de la densité optique (absorbance) en fonction de la concentration des deux souches <i>E.C</i> et <i>S.A</i> soumises au (PEG 3400). (625nm).....	25
<b>Figure n°20</b>	Evolution de la densité optique (absorbance) en fonction de la concentration des deux souches <i>E.C</i> et <i>SA</i> soumises aux dilutions AB.....	25
<b>Figure n°21</b>	Evolution de la densité optique (absorbance) en fonction de la concentration des deux souches <i>EC</i> et <i>SA</i> soumises à l'effet des conjugués (PEG 3400/ABG).	26

## Liste des abréviations

**EDS** : L'eau distillée stérilisée

**PEG** : Polyéthylène glycol

**ABG** : Antibiotique Gentamicine

**S.A** : *Staphylococcus aureus*

**E.C** : *Escherichia coli*

**DO** : Densité optique

**MH** : Muller Hinton

**BN** : Bouillon nutritif

# **INTRODUCTION**

Ces dernières années, les infections bactériennes sont devenues un problème clinique très sérieux en raison de la propagation rapide de maladies commensales ou pathogènes, difficiles à traiter et souvent mortelles.

Il est important de savoir qu'il existe des différentes souches bactériennes responsables de ces infections, parmi lesquelles on trouve d'une part les cocci Gram positif comme *Staphylococcus aureus*, qui peuvent vivre dans la nature (sols, air, eaux, aliments...), commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifères), résiste à de nombreux agents chimiques ou physiques, elle est capable de vivre dans une activité d'eau ( $a_w$ ) entre 0,95 et 0,91, et qu'il est capable de survivre sans se multiplier à des valeurs d' $a_w$  proche de 0,85. (Schaechter; et al., 1999)

D'autre part, on trouve les cocci Gram négatif comme *Escherichia coli* (entérobactérie), ce pathotype présente plusieurs types d'infections comme les infections intestinales et extra-intestinales (par exemple, infections urinaires, septicémie) et s'associe à des cellules de mammifères tout en étant extracellulaires ou intracellulaires. (Frankel, Gad, Ron, 2018)

Pour lutter contre les diverses infections, les scientifiques ont développés des procédés innovants comme méthodes chaleur, radiation, acides forts et les antibiotiques. Ces derniers éliminent un large spectre d'espèces bactériennes, soit par les tuer (effet bactéricide) ou d'inhiber simplement leur croissance (effet bactériostatique) sans affecter les cellules eucaryotes de l'hôte humaine ou animale (Bambeke, 2008).

Malheureusement, l'utilisation inadéquate et/ou excessive d'antibiotiques, combinée à la capacité de la bactérie de résister, de se muter et de s'adapter au traitement, a conduit à une émergence très inquiétante de bactéries de plus en plus résistantes, et par conséquent, rend leurs traitements encore plus difficile (Pasquier et al., 2017).

Face à la recrudescence des résistances aux antibiotiques, des chercheurs essaient toujours des alternatives pour éliminer les bactéries multi-résistantes. Ainsi, plusieurs recherches sont parues dans des journaux scientifiques renommés, suggèrent d'utiliser les polymères pour tuer des bactéries résistantes aux antibiotiques. Ces recherches confirment que les polymères, et parmi eux le polyéthylène glycol (PEG), seraient particulièrement efficaces pour détruire les différentes bactéries, sans nocivité pour l'organisme (Nalawade et al., 2015). (Pasquier et al., 2017) (Schaechter; et al., 1999).

Le polyéthylène glycol (PEG) est une macromolécule issue de la polymérisation d'unités d'oxyde d'éthylène (éthoxylation). Ce polymère synthétique fait partie de la famille

des polyéthers linéaires de masse moléculaire inférieure à 20000 g.mol<sup>-1</sup>.(Nalawade et al., 2015). Ce polymère peut être sous différents poids moléculaires, et présente des qualités physico-chimiques et biologiques remarquables incluant l'hydro solubilité et liposolubilité élevée, sa biodégradation à température ambiante, sa biocompatibilité et le fait qu'il est éliminé par filtration rénale pour de faibles poids moléculaires (Greenwald et al., 2003), (Duncan, 2003).

En addition à cela, le PEG est de très faible toxicité, Il ne provoque aucune irritation ou sensibilisation de la peau et ne semblent pas être absorbable par celle-ci. Ces caractéristiques en font de lui un composé très demandé en microbiologie (Nalawade et al., 2015) dans l'industrie, entrant dans la composition de certains pesticides comme de cosmétiques, ils servent à la production de cellophane, ils sont employés dans le traitement et la stabilisation du papier, dans médecine (Peng et al., 2017), (Pasquier et al., 2017).

Notre choix s'est porté sur le poly éthylène glycol (PEG-3400), notre choix est motivé, en plus de ces caractéristiques citées auparavant, par sa disponibilité, son coût qui est relativement bas et son originalité dans le domaine de la microbiologie.

Dans notre présent travail, on va s'intéresser principalement à l'étude expérimentale par des essais *in vitro* dans le but de tester l'effet antibactérien du PEG-3400 face à un antibiotique, qui est la gentamicine, sur deux bactéries à savoir une de Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et l'autre de Gram négatif (*Escherichia coli*). Cependant, il est important de signaler que l'usage du PEG-3400 dans la lutte bactérienne restent encore non supportés par des études scientifiques, d'où l'intérêt de notre travail.

Le premier chapitre décrit le matériel ainsi que les différentes méthodes utilisées pour l'ensemble de notre expérimentation.

Enfin, le deuxième chapitre, qui représente l'essentiel de notre travail, où on présentera les différents résultats obtenus en essayant de les interpréter et discuter.

Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale qui résumera l'ensemble des résultats *in vitro* issus de cette étude et présentera ainsi les perspectives de notre étude à réaliser dans l'avenir avant de pouvoir l'utiliser comme agent antimicrobien alternatif dans le traitement des infections.

**Chapitre I :**  
**MATÉRIEL & METHODES**

## **I.1- Objectifs du travail :**

L'objectif principal de cette étude consiste à entreprendre une étude expérimentale par une série d'essais *in vitro* dans le but de tester l'activité antibactérienne du polyéthylène glycol 3400 (PEG-3400) par rapport à un antibiotique (gentamicine) sur deux souches bactériennes *Escherichia coli* (Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (Gram positif). L'évaluation de l'effet antibactérien est bien menée grâce à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

## **I.2- Lieu et période du travail:**

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de la Microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ibn Khaldoun, Tiaret. L'étude s'est étalée du 06/05/2021 et jusqu'au 10/06/2021.

## **I.3- Matériel utilisées:**

### **I.3.1- Matériel biologique:**

Deux souches bactériennes appartenant au laboratoire de la Microbiologie de notre faculté, sensibles aux antibiotiques, ont été utilisées comme étant des bactéries de tests au cours de la détermination de l'activité antibactérienne du PEG-3400 et de l'AB, et qui sont:

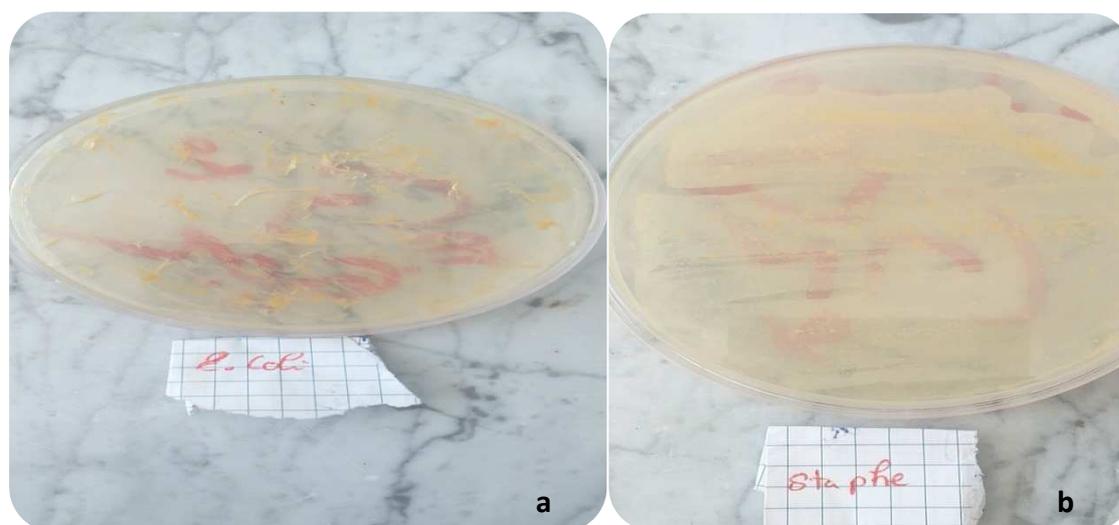
- *E.C* : c'est une bactérie à Gram négatif.
- *S.A* : c'est une bactérie à Gram positif.

Nous avons choisi de travailler sur ces souches par ce qu'ils font partie des bactéries du tube digestif (dite commensal et pathogène parfois), ainsi pour avoir une idée sur le spectre d'activité antibactérienne de notre produit (voir Annexe N°1).

### **I.3.1.A. Standardisation de l'inoculum bactérien :**

A partir des cultures jeunes de 24h d'incubation pour chaque souche ; deux à trois colonies bien isolées ont été prélevées à l'aide de l'anse de platine stérilisée puis incorporées dans un tube à essai stérile contenant BN ; l'ensemble a été bien agité par un vortex pendant quelques secondes.

Selon les normes McFarland la standardisation de la suspension de  $10^6$  UFC/ml a été réalisée par un spectrophotomètre UV-vis réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,13, l'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de bactérie s'il est trop faible, ou bien le BN s'il trop fort. La figure n°1 montre les souches bactériennes utilisées lors de cette étude.



**Figure n° 01** : Culture des souches utilisées dans une boîte de pétri (a) EC et (b) SA.

### ***1.3.1.B. Milieux de culture :***

Le milieu Mueller-Hinton est le milieu par excellence pour l'étude de la sensibilité des bactéries aérobies et anaérobies facultatives vis à vis des agents antimicrobiens. En plus, il est recommandé par le Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie (**Denis et al., 2007**) et il est utilisé pour tester la sensibilité de nos souches bactériennes à la gentamicine et au PEG-3400. Ces deux produits ont été procurés du laboratoire de la Microbiologie de notre université.

Il est à noter que la composition pour le bouillon Mueller-Hinton est la même que celui en gélose, mais ce dernier contient l'agar en plus dans sa composition (voir figure n°2). Le bouillon a été utilisé lors des expériences de la CMI en tube par la technique de dilution en série pour le PEG et dilution en dixième pour l'AB, par contre le MH en gélose est utilisé dans les tests de diffusion en milieu solide et pour détermination de la CMB.

### ***1.3.1.C. Préparation du bouillon MH :***

Pour la préparation du MH en bouillon, on dissout 4.2 g dans 200ml d'EDS, on agite à l'aide d'un agitateur et on stérilise le produit final dans l'autoclave à une température de 121 °C, sous une pression de 1 bar pendant 15 minutes. Enfin, le MH en bouillon est conservé dans le réfrigérateur à une température ambiante. 4°C

### ***1.3.1.D. Stérilisation de MH gélosé :***

Le milieu de culture MH (Muller Hinton) gélosé a été stérilisé à l'autoclave à une température de 121°C, sous une pression de 1 bar pendant 15 minutes. Après refroidissement du milieu, à

environ 45°C ; ce milieu va être le support de nos expériences en milieu solide, notamment pour la détermination de la CMB.

La composition du milieu MH utilisé (bouillon et gélose) est décrite dans l'annexe n°02.



**Figure n° 02** : Milieu de culture Muller Hinton (a) en gélose et (b) en bouillon.

### 1.3.2. Préparation de la solution PEG 400 :

Afin de tester l'activité antibactérienne du PEG-3400, une solution mère a été préparée en dissociant 20 g de la poudre du PEG 3400 dans un volume de 10 ml EDS, soit une concentration de 2g/ml, puis agité à l'aide d'un agitateur jusqu'à l'homogénéisation

La concentration pondérale  $C_p$  en (g/ml) du PEG-3400 est obtenue par l'équation (I.1) :

$$C_p = \frac{m \text{ PEG}(g)}{V(\text{EDS}) (ml)} \quad (\text{I.1})$$

Tel que :

$m \text{ PEG}$  : est la masse du PEG-3400 en (g)

$V(\text{EDS})$  : est le volume d'eau distillé stérilisé.

### 1.3.3. Produits et appareillage :

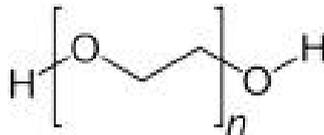
Nous avons utilisé deux produits de base pour la lutte bactérienne, à savoir le PEG-3400 et un antibiotique qui est la gentamicine comme le montre la figure n°03.



**Figure n° 03** PEG-3400 et gentamicine 80mg/2ml.

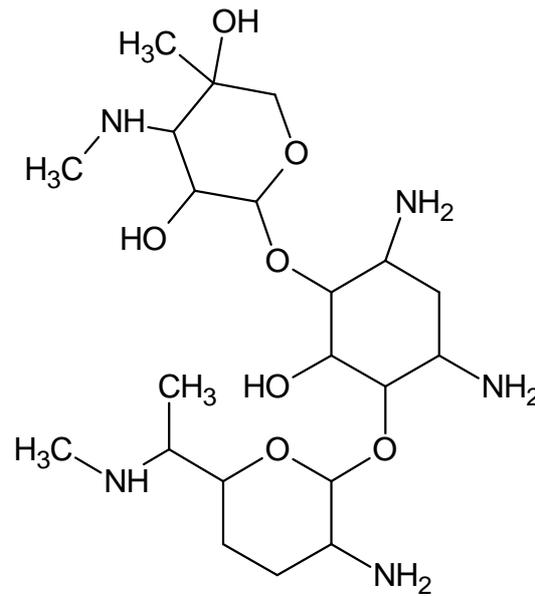
Dans cette partie on va détailler un peu plus sur ces deux substances :

- Polyéthylène glycol (PEG-3400) : Le polyéthylène glycol qui est un polymère semi-cristallin, biocompatible à caractère hydrophile qui peut être synthétisé par polymérisation anionique, cationique ou par ouverture de cycle d'un monomère d'éthylène glycol. Les poids moléculaires obtenus varient généralement entre  $200 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $2000000 \text{ g.mol}^{-1}$ . Notre polymère PEG-3400 d'une pureté de 99.99% a été acheté chez Sigma Aldrich, sa structure chimique de son unité de répétition est schématisée sur la figure n°04.



**Figure n°04** : Structure chimique du polyéthylène glycol 3400.

- Un antibiotique Gentamicine 80mg/20ml, il est connu sous le nom commerciale gentamicine, c'est un antibiotique de la famille des aminosides (Amin-glycosides). Il est connu par large spectre d'action, son efficacité et son coût relativement faible font de cet antibiotique un des agents de choix dans le traitement de divers types d'infections bactériennes (Siegenthaler et al., 1986) La structure chimique de sa molécule est représentée sur la figure n°05.



**Figure n°05** : Structure chimique de la Gentamicine.

Les matériels nécessaires qui ont été utilisés pendant cette étude, ainsi que les différents appareillages et les milieux de cultures sont indiqués dans le tableau n° 01.

**Tableau n°01** : Appareillage et produits utilisés lors de cette étude.

Appareillage	Produits	Autres
*Vortex «TECHNO KARTELL» - * Incubateur «MEMMERT 854 SCHWABACH WGERMANY» - *Autoclave «WOLF WESKZEUGVORRICHLUNGSUN .7340 GEISLINGEN » * Spectromètre FTIR *Spectromètre Raman * Agitateur «IKAMAG»	* Eau distillée stérile *PEG-3400 *Muller Hinton en gélose * Muller Hinton en bouillon *Antibiotique	* Bec Bunsen * Boîtes de Pétri *Ance de platine * Tubes à essais stérilisés * Flacons * Bêchers * Pissettes * Ecouvillon * Portoir de tube a essais * Micropipettes (5-50µL). * Micropipettes (50- 200µL).

## **I.4- Méthodes :**

### **I.4.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge et Raman du PEG-3400 :**

La spectroscopie Raman permet d'analyser la composition chimique d'un échantillon par l'étude de la diffusion inélastique de la lumière monochromatique (généralement une source laser qui va exciter l'échantillon) (**Barbillat et al., 1999**) & (**Schaechter; et al., 1999**) L'interaction entre la source laser et l'échantillon va provoquer qu'une fraction des photons est diffusée sans variation d'énergie (diffusion Rayleigh), et une autre est diffusée avec un décalage d'énergie appelé effet Raman. Ce décalage de fréquence est constitué d'une partie dite Stokes (décalage vers une fréquence plus faible) et une dite anti-Stokes (décalage vers une fréquence plus élevée). La différence entre l'énergie vibrationnelle du rayon incident et celle de l'échantillon est détectée par spectroscopie Raman (**Wei et al., 2014**) Le spectre obtenu est composé de différentes bandes associées aux différents modes vibrations spécifiques aux liaisons chimiques du composé considéré. Dans notre cas, nous avons utilisé un Spectromètre Raman de type HR800 HORIBA (Jobin Yvon Microspectrometer) mené d'une source laser Ar/Kr opérant à 532 nm pour caractériser notre PEG-3400.

Concernant maintenant la spectroscopie infrarouge, qui est une technique complémentaire du Raman, un rayonnement incident dans le domaine de l'infrarouge modifiant l'énergie vibrationnelle et l'énergie rotationnelle de la molécule qui compose notre échantillon, induisant une variation du moment dipolaire électrique de cette molécule. Alors que la diffusion Raman permet une forte absorption des liaisons carbonées, l'absorption infrarouge met en lumière les liaisons polaires ayant un fort moment dipolaire, c'est le cas des groupements fonctionnels C-H, O-H, N-H, C-O...etc. (**Jourdain, 2016**). Les spectres infrarouge représentent les bandes fondamentales de ces liaisons chimiques ainsi que leurs différents modes de vibrations ( $\nu$ , élongation;  $\delta$ , déformation,  $\gamma$  pour le mode de balancement). Afin de caractériser la composition chimique du PEG-3400 nous avons utilisé un spectromètre infrarouge de type Perkin-Elmer, L'analyse a été faite sur une plage de longueur d'ondes allant de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **I.4.2- Protocole expérimental:**

Les différentes étapes nécessaires pour la détermination de la CMI et la CMB en allant de la préparation des solutions antibactériennes (gentamicine et PEG3400) jusqu'à la détermination des CMI et CMB, ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie à

la faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université Ibn-Khaldoun Tiaret, selon le protocole expérimental de la figure n°6.

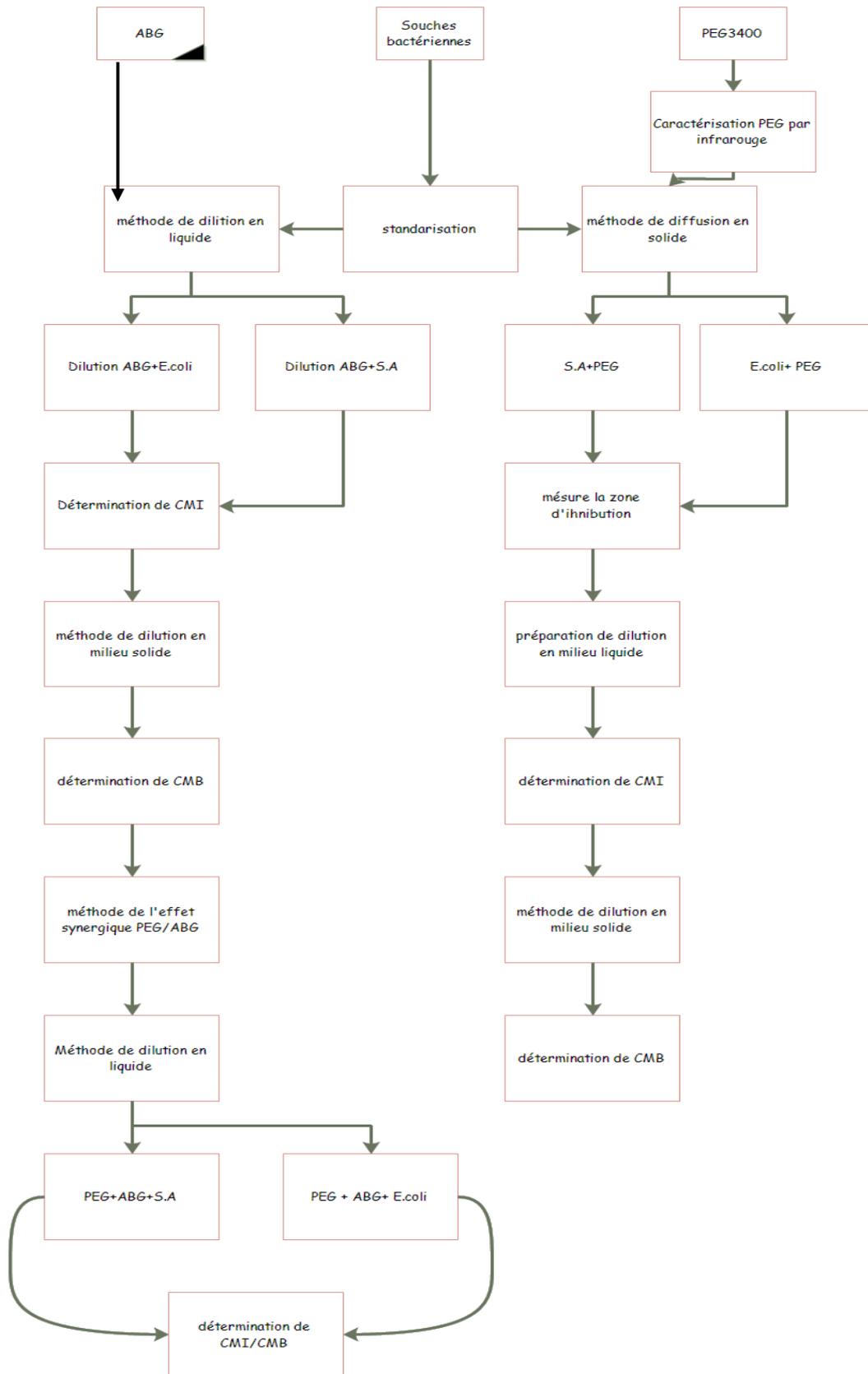


Figure n°06 : Schéma du protocole expérimental adopté lors de cette étude.

## **I.4.2. Description du protocole :**

### **I.4.2.1: Détermination in-vitro de l'activité antibactérienne d'antibiotique sur les souches bactériennes**

#### ***I.4.2.1.1: Détermination la CMI pour les deux souches bactérienne***

On a préparé le test de dilution antibiotique pour voir l'effet de ce dernier sur les deux souches bactériennes (*E.C* et *S.A*).

##### ***I.4.2.1.A. Préparation des dilutions du l'antibiotique :***

Afin d'examiner l'effet de l'AB à tester, en milieu MH sur nos souches bactériennes en milieu liquide, une première série consiste à faire des dilutions en série de l'inoculum, allant de la dilution  $10^{-1}$  jusqu'à la dilution  $10^{-10}$  sont réalisées sur notre AB Gentamicine de concentration initiale 80mg/2ml. Cette opération consiste à préparer 10 tubes à essais numéroté on ordre croissant, remplie initialement par 9 ml EDS à l'aide d'une pipette de 1ml on prélève 1ml de l'ABG et en l'introduisant dans 9ml EDS du premier tube à essai pour la dilution  $10^{-1}$  de (ABG+ EDS), ensuite 1ml du premier tube sera introduit dans le second tube à essai afin de réaliser la dilution  $10^{-2}$ . Cette opération est répété jusqu'à atteindre la dilution  $10^{-10}$ . On note que le volume (1ml) extrait du dernier tube de la dilution est omis.

Et pour 2ème série ont va verser 2ml de MH qui était préparée paravent dans la section (I.3.1.D) dans 10 tubes à essai numéroté en ordre puis ajoutée 0.2 ml de la solution bactérienne dans tous les tubes.

La dernière chose c'est l'ajout de 1ml de chaque dilution d'antibiotique série 01 dans chaque tube de série 02 numéroté en ordre croissant et mises en incubation à l'étuve à la température de 37°C pendant 24h.

L'expérience se refait pour chaque souche bactérienne *EC* et *SA*

- A partir de ces expériences on peut déterminer la CMI.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), est définie comme la plus petite concentration d'une substance antimicrobienne en (mg/l), testée sur la souche bactérienne étudiée, capable d'inhiber in-vitro la croissance visible d'un inoculum bactérien de taille standardisée. Elle permet cependant d'évaluer la sensibilité des souches bactériennes aux agents antibactériens et antibiotiques.

#### ***I.4.2.2: Détermination la CMB pour les deux souches bactérienne :***

Il est également possible à partir de la même méthode défini auparavant de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) qui est définit par la plus petite concentration d'un

agent antibactérien ou un antibiotique permettant de tuer le pathogène (**National Committee for Clinical Laboratory Standards, & Barry, 1999**). Cependant, les tubes à essais dans lesquels aucune croissance n'est visible à l'œil nu sont ensemencés sur le milieu de culture MH gélosé afin de déterminer quelle est la concentration de notre agent antibactérien ou de l'antibiotique qui a permis de tuer 99.9% des bactéries. Il est à noter, que notre agent antibactérien ou antibiotique seront estimés bactéricides si leurs CMB obtenus est inférieure à 4 fois sa CMI, par contre ils seront considérés comme bactériostatiques dans le cas contraire.

Pour cela, et après la détermination de la CMI en deuxième jour de l'expérience, les contenus des tubes à essais, ne présentant pas de trouble visible à l'œil nu sont ensemencés dans des boîtes de pétri de façon identique et incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 h. Cette expérience est réalisée pour chaque souche bactérienne. La CMB se lit au troisième jour de l'expérience, par comparaison du nombre de survivants des germes bactériens de ou de la boîte de pétri à celle de la boîte témoin.

### **I.4.3. Détermination in-vitro de l'activité antibactérienne du PEG 3400 sur les souches bactériennes :**

#### **I.4.3.1. Estimation préliminaire du PEG par méthode de diffusion où milieux solide :**

- Préparation des disques : utilisation de papier filtre pour former des disques qui ont été stérilisés dans autoclave puis incorporés dans le bouillant de culture qui contient notre PEG dissout dans EDS (on mélange 1.7 mg PEG + 1ml EDS puis on agite à l'aide d'un vortex)
- Coulé les boîtes pétri : après refroidissement de MH gélosé, à l'aide d'un écouvillon on ajoute 0.2 ml de la solution bactérienne puis on étale en lamelle
- Déposée les disques dans le centre géométrique des boîtes pétri à l'aide de pince stérilisée, incubation à 37°C pendant 24h (cette technique appelée l'aromatogramme).

#### **I.4.3.2. Préparation des dilutions du PEG 3400 :**

D'abord on a versé 2ml de MH déjà préparée dans 15 tubes à essai, à l'aide d'une pipette de 5ml on prélève 2ml de solution mère du PEG-3400 préparé auparavant une série de dilutions successives (Two-fold serial dilutions) a été effectuée selon une progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$  de façon à obtenir les dilutions suivantes: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 et 1/1024. Sauf que le tube (+) contient pas de PEG3400. (**Oussou et al., 2004**) ; La gamme de concentrations finales atteintes du PEG-3400 dans les tubes va de 0,002 g/ml à 2g/ml, Il est à noter, que le volume 2ml restant du dernier tube N°15 sera jeté.

Ensuite des volumes de 0.2 ml de la solution bactérienne seront ajoutés dans chaque tube numéroté en ordre croissant sauf le tube (-) qui ne contient pas les bactéries et mis en incubation à l'étuve à la température de 37 °C pendant 24h.

\*L'expérience est répétée pour chaque souche bactérienne *EC* et *SA*.

Après ces étapes et les résultats obtenus, on a pensé de faire l'effet synergique entre l'antibiotique et PEG3400 pour obtenir un meilleur résultat.

## **I.5.Détermination *in-vitro* effet synergique du PEG/AB sur les souches bactériennes :**

### **I.5.1.Détermination *in-vitro* la CMI de PEG/AB pour les souches bactérienne en milieu liquide :**

Les résultats obtenus dans la première phase de notre travail, nous ont encouragés d'examiner l'effet combiné du PEG-3400/ABG sur nos souches bactériennes. Afin de déterminer l'effet de l'association PEG-3400/ABG, des solutions de différentes fractions molaires de ABG et PEG sont préparées à partir de la connaissance de la CMB de l'AB sur chaque souches bactériennes (tableau n°02 : différentes fractions PEG/AB).

Les masses du PEG-3400 ainsi que les volumes ABG correspondants à chaque fraction molaire obtenus sur la base de la CMB de l'ABG déjà trouvée sont calculés à l'aide d'un raisonnement chimique qui a aboutis aux équations finales (I.7) et (I.8) :

Pour les deux souche (*E.C* et *S.A*), On a trouvé que la CMB = 0,4 mg/ml.

On a :

$$\frac{m_{AB} + m_{PEG}}{V} = 0,4 \text{ mg/ml} \Rightarrow m_{AB} + m_{PEG} = 0,4 \times V \quad (\text{I.2})$$

Tel que  $m_{AB}$  c'est la masse de l'antibiotique (Gentamicine dans notre cas) en mg

$m_{PEG}$  c'est la masse du PEG en mg

$V$  : C'est le volume de la solution finale soit de 2ml.

Maintenant par définition de la fraction molaire :

$$F_{AB} = \frac{n_{AB}}{n_{AB} + n_{PEG}} \Rightarrow n_{AB} = F_{AB}(n_{AB} + n_{PEG}) \quad (\text{I.3})$$

Tel que :

$F_{AB}$  : est la fraction molaire de ABG.

$n_{AB}$  : le nombre de moles de l'ABG (en mole).

$n_{PEG}$  : est le nombre de moles du PEG-3400 (en mole).

$$n_{PEG} = \frac{n_{AB} - F_{AB} \times n_{AB}}{F_{AB}} = n_{AB} \left( \frac{1}{F_{AB}} - 1 \right) \quad (\text{I.4})$$

Maintenant on passant des nombres de moles vers les masses :

$$\frac{m_{PEG}}{M_{PEG}} = \frac{m_{AB}}{M_{AB}} \left( \frac{1}{F_{AB}} - 1 \right) \Rightarrow m_{PEG} = m_{AB} \times \frac{M_{PEG}}{M_{AB}} \left( \frac{1}{F_{AB}} - 1 \right) \quad (I.5)$$

Où  $M_{AB}$  est la masse molaire du gentamicine (soit 477,596 g/mol).

$M_{PEG}$  est la masse molaire du PEG (soit 3400 g/mol)

Pour ne pas allourdir nos équations, on définit  $W = \frac{M_{PEG}}{M_{AB}} \left( \frac{1}{F_{AB}} - 1 \right)$  tel que ;

Ce qui revient à dire  $m_{PEG} = m_{AB} \times W$  et revenant maintenant à l'équation (I.2) :

$$m_{AB} = \frac{0,8}{1+W} \quad (I.6)$$

$$\text{Donc en fin : } \begin{cases} m_{AB} = \frac{0,8}{1+W} \\ m_{PEG} = 0,8 - m_{AB} \end{cases} \quad (I.7)$$

Puisque nous disposons d'un antibiotique sous forme liquide, Calculons le volume  $V_{AB}$  correspondant à la masse  $m_{AB}$ :

$$C_{p_{AB}} = \frac{m_{AB}}{V_{AB}} \Rightarrow V_{AB} = \frac{m_{AB}}{C_{p_{AB}}} \quad (I.8)$$

Tel que  $V_{AB}$  : est le volume de l'ABG qu'il faudra le prélever pour chaque fraction molaire en (ml).

$C_{p_{AB}}$  : est la concentration pondérale de l'ABG qui est de 40mg/ml.

L'activité antibactérienne du conjugué (PEG-3400/ABG) sur chaque souche bactérienne a été évaluée quantitativement par détermination des concentrations (CMB) pour les dilutions ABG. Le conjugué antibactérien aux différentes fractions molaires à savoir 100/0, 80/20, 60/40, 40/60 et 20/80 est introduit dans le milieu de culture MH. Le tableau n°02 résume les valeurs de masses et de volumes utilisés pour la préparation des différentes solutions.

**Tableau n° 02** : Différent fraction molaires du (PEG-3400/AB).

Proportions en % (AB/PEG-3400)	100/0	80/20	60/40	40/60	20/80
FAB	1,000	0,800	0,600	0,400	0,200
mPEG-3400(mg)	0,000	5,122	6,608	7,315	7,729
VAB (µl)	200	72	35	17	7

On remplit 2ml de MH qui a été préparé auparavant, dans tous notre tubes numéroté 1 jusqu'à 5 puis on ajoute le mélange PEG / ABG avec différentes fraction molaires en respectant les proportions établie dans le tableau n°02.

Après on ajoute 0.2 ml de la solution bactérienne dans chaque tube numéroté en ordre croissant. Les différents tubes ont été mis en incubation des tubes à l'étuve pendant 24h à la température de 37°C.

### ***1.5.2.Détermination in-vitro la CMB de PEG/AB pour les souches bactérienne***

On a coulé les boîtes de pétri de 90 mm de diamètre par notre MH avec leur couvercles qui sont déposés horizontalement pour faciliter le refroidissement et la solidification ; et à l'aide d'un écouvillon, prélevé une quantité de chaque solution des tubes en ordre ; puis étalés dans les boîtes, et mises en incubation à l'étuve à la température de 37 °C pendant 24 h.

L'expérience est répétée pour chaque souche bactérienne tant qu'on a le même CMB pour *EC* et *SA* avec les mêmes fractions molaires

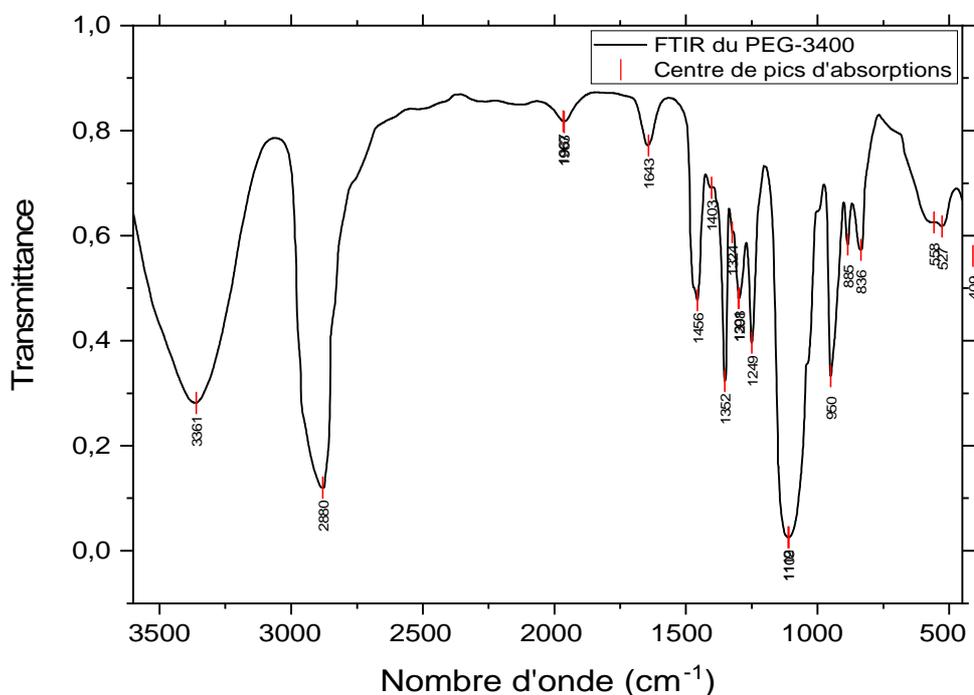
**Chapitre II :**  
**RÉSULTATS & DISCUSSION**

## II.1.Caractérisation spectroscopique du PEG-3400 :

### II.1.1.Caractérisation infrarouge et Raman :

Le spectre infrarouge (FTIR) du PEG-3400 est obtenu dans la région spectrale entre 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  est représenté sur la Figure n°06. L'attribution des bandes d'absorption en termes de modes de vibration est basée sur des études de la littérature (**Paun et al., 2010**)

Les différents pics caractéristiques aux modes vibrations, récapitulés dans le tableau 03, sont attribués aux groupements fonctionnels du PEG. D'après notre analyse spectrale on remarque la présence de tous les groupements fonctionnels ( $\text{CH}_2$ , OH, COC, CCO et COH) qui sont caractéristique de la chaîne moléculaire du PEG mentionné dans la figure n°04.



**Figure n°07 :** Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FTIR) du PEG-3400.

La figure n°08 illustre le spectre Raman de la poudre PEG-3400 enregistré dans la zone spectrale allant de 450-3500  $\text{cm}^{-1}$ . On remarque que le spectre obtenu montre la présence de pics spécifiques relatifs aux groupements fonctionnels de la chaîne polymérique PEG. On affirme aussi que presque la majorité des fréquences observées en FTIR sont aussi observées en Raman et ils sont attribués aux différents groupements chimiques de la chaîne du polymère (voir Tableau n°03). On remarque l'absence de certaines fréquences en Raman, ceci est dû principalement à la sensibilité de l'appareil utilisé pour les faibles intensités de vibrations. Tous ces résultats confirment bien la pureté de notre polymère.

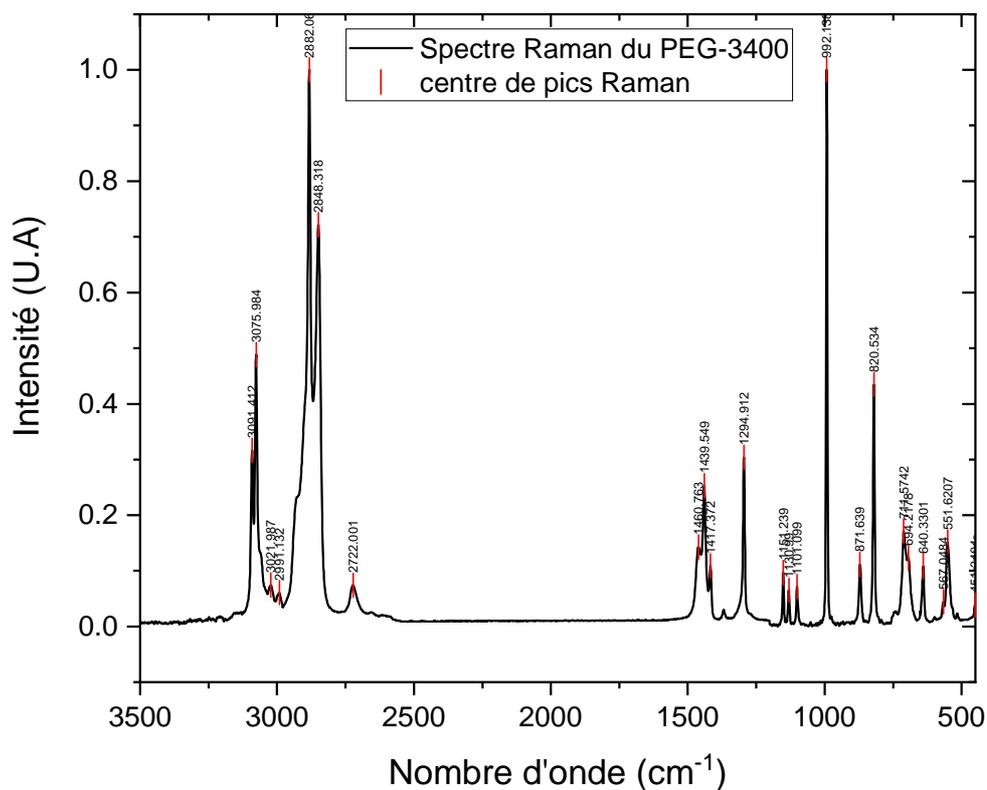


Figure n°08 : Caractérisation par spectroscopie Raman du PEG-3400.

Les positions et attributions des bandes infrarouges et Raman du PEG sont données dans le Tableau n°03

Tableau n°03 : Attribution des bandes d'absorption infrarouges du spectre du PEG-3400.

Nombre d'ondes (cm <sup>-1</sup> ) (IR)	Nombre d'ondes (cm <sup>-1</sup> ) (Raman)	Attributions
3361	3091.4-3022.0	$\nu$ (O-H)s
2880	2882.1	$\nu$ (CH <sub>2</sub> )a hors plan
1967	-	$\gamma_r$ (CH <sub>2</sub> )s + $\nu_s$ (C-O-C)
1963	-	$\gamma_r$ (CH <sub>2</sub> )s + $\nu_s$ (C-O-C)
1643	-	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )a
1456	1460.8	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )a + $\delta$ (CH <sub>2</sub> )s
1403	1417.4	$\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )a
1352	1371.1	$\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )s
1324	-	$\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )a

1301	-	$\delta(\text{C-OH})$
1298	1294.9	$\gamma_t(\text{CH}_2)_a + \gamma_t(\text{CH}_2)_s$
1249	1234.1	$\gamma_t(\text{CH}_2)_a$
1112	1130.99	$\nu(\text{C-O-C})_a$
1109	1101.1	$\nu(\text{C-O-C})_a$
950	992.1	$\gamma_r(\text{CH}_2)_a + \nu_a(\text{C-O-C})$
885	871.6	$\nu(\text{C-C-O})$
836	820.5	$\gamma_r(\text{CH}_2)_a$
558	567.0	$\gamma_r(\text{CH}_2)_a$
527	551.6	$\delta(\text{CH}_2)_a$

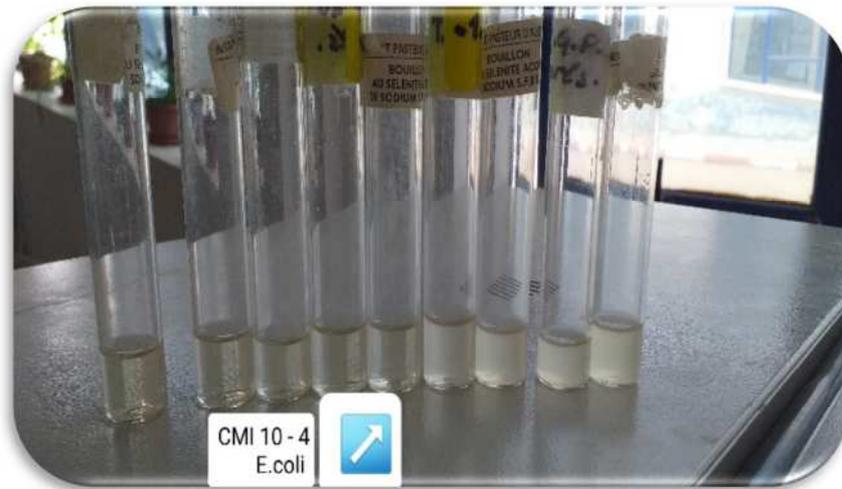
- $\nu$  pour le mode d'élongation (stretching).
- $\delta$  pour le mode déformation (bending).
- $\gamma_r$  pour le mode balancement (rocking).
- $\gamma_w$  pour le mode agitation (wagging).
- $\gamma_t$  pour le mode torsion (*twisting*).

**N.B :** Le signe (s) représente une vibration symétrique par contre le signe (a) représente une vibration asymétrique.

## **II.2.Détermination *in vitro* de la CMI de l'antibiotique sur les souches bactériennes :**

### **II.2.1 : Pour souche *E.C* :**

Après 24h d'incubation, et comme le montre la figure n°09, on a observé que les tubes numérotés de 1 et jusqu'à 4 sont visuellement claire, par contre les tubes numérotés de 5 et jusqu'à 10 présente une turbidité due à la croissance de la bactérie *E.C*. Cependant, Pour les tubes claires signifie que il 'y a une inhibition de la croissance de la bactérie *E.C* qui se traduit par un effet bactériostatique. Après l'évaluation de ces résultats, on peut dire que la CMI de notre AB vis-à-vis *E.C* est situé au tube qui porte la dilution  $10^{-4}$  (soit une concentration de  $4\mu\text{g/ml}$ ). On rappelle qu'il n'y a pas un effet d'inhibition pour des concentrations inférieures à la CMI.



**Figure n° 09** : Détermination de la CMI de l'AB vis à vis *E.C.*

### ***II.2.3. Pour souche S.A :***

En ce qui concerne la deuxième souche (*S.A*) présenté dans la Figure n°10, Après 24h d'incubation, on observe la présence de tubes claires portant les numéros de 1 et jusqu'à 8, tandis que les tubes numéroté 9 et 10 sont troubles ce qui signifie qu'il y'a eu une croissance bactériennes dans ces deux tubes.



**Figure n° 10** : Détermination de la CMI de l'AB vis à vis staphylococcus aureus.

Les tubes clairs signifient qu'une inhibition importante d'AB sur SA comparativement à son effet sur EC. En revanche, les tubes trouble notamment le 9<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> tube ce qui signifie il y a une croissance bactérienne. Sur la base de notre observation, la CMI est celle du tube correspondant à la dilution 10<sup>-8</sup> soit la concentration de (0.0004µg/ml).

#### **II.2.4 : Discussion**

Les tubes clairs de EC et SA à cause de l'effet bactéricides d'aminosides qui sont des antibiotiques bactéricides « gentamicines » d'action rapide qui inhibent la synthèse protéique des bactéries.

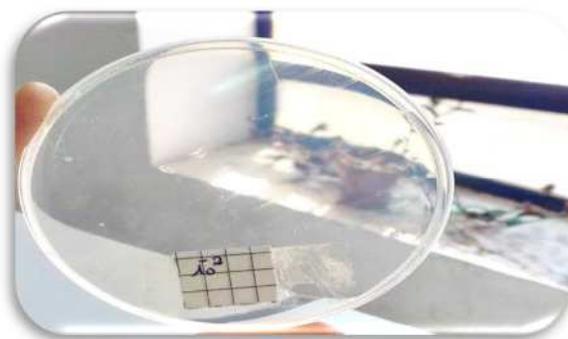
La première étape du mode d'action consiste en la pénétration intracellulaire via la membrane externe des bactéries à Gram négatif et Gram positif. Ce passage intracellulaire est un transport actif dépendant d'un gradient électrochimique nécessitant de l'oxygène.

La seconde étape du mode d'action est l'inhibition de la synthèse protéique par laquelle la gentamycine se fixe principalement sur la sous-unité 30s du ribosome. Cette fixation est à l'origine de nombreuses erreurs dans les protéines synthétisées dont l'accumulation entraîne une désorganisation et une altération de la membrane cytoplasmique qui provoquent la mort de la bactérie hôte.

### **II.4. Détermination de la CMB pour les deux souches bactérienne :**

#### **II.4.1 : Pour EC :**

La figure n°11 montre la croissance sur support solide après incubation de 24h du tube correspondant à la dilution 10<sup>-2</sup> (soit d'une concentration de 0,4mg/ml). On observe que la croissance bactérienne dans la boîte de pétri nous informe que notre AB a un effet bactériostatique sur la bactérie plus que effet bactéricide car la fixation irréversible sur le ribosome est responsable de l'effet post-antibiotique prolongé qui se définit comme étant la poursuite de l'action de l'antibiotique malgré la faible quantité restante dans l'organisme.



**Figure n°11 :** Détermination la CMB de l'AB vis à vis EC.

#### II.4.2 : Pour S A :

Pour la deuxième souche SA (voir figure n°12), On remarque pratiquement le même résultat que celui obtenu sur EC. La croissance bactérienne obtenue à partir du tube correspondant à la dilution  $10^{-2}$  (soit d'une concentration 0,4 mg/ml) montre que l'ABG a un effet important d'inhibition mais un faible effet pour tuer toute la bactérie.



Figure n°12: Détermination la CMB de l'ABG vis à vis S.A.

### II.5. Détermination *in vitro* de la CMI du PEG sur les souches bactériennes :

#### II.5 .1. Estimation préliminaire de l'effet du PEG sur les souches bactériennes par la méthode de diffusion:

Le test préliminaire dans un milieu solide nous a permis d'avoir une idée sur l'efficacité du PEG-3400 pour inhiber la croissance des deux souches étudiées. Après 24h d'incubation, Nous avons observé des petites zones d'inhibitions pour les deux bactéries EC et SA qui montre un effet mineur de PEG sur ces souches, et on a observé aussi que l'effet d'inhibition sur EC est relativement meilleur que sur SA. **figure n°11.**

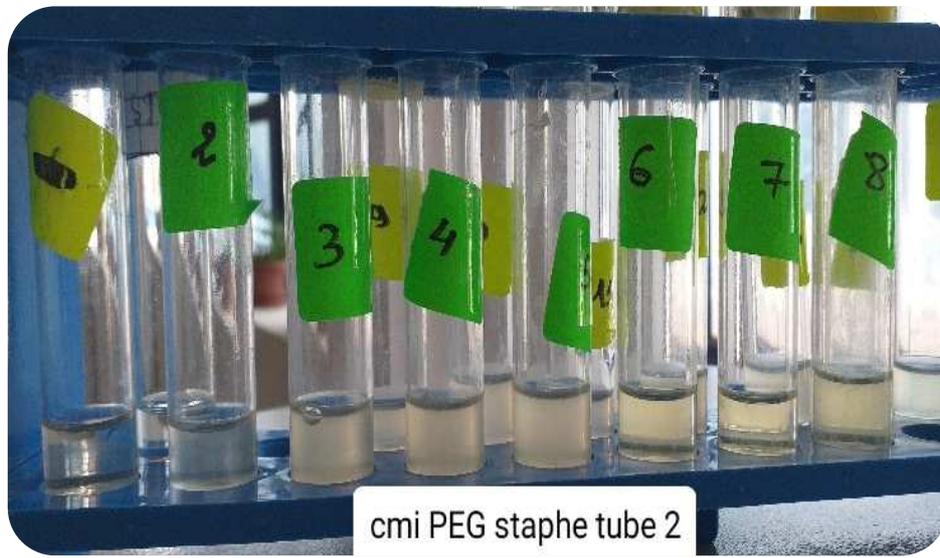


Figure n°13 : Test préliminaire par la méthode de diffusion du PEG vis à vis la croissance bactérienne, (a) E.C, (b) S.A.

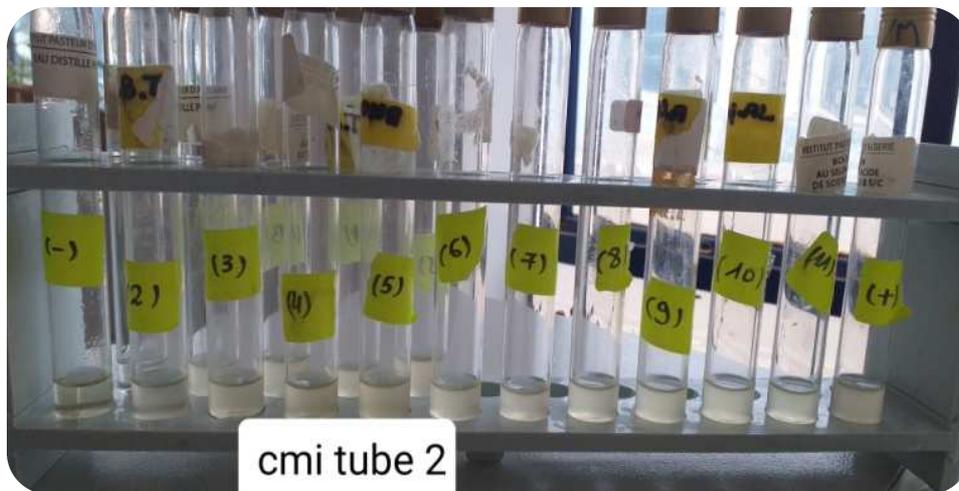
## ***II.5.2 Détermination in-vitro de l'activité antibactérienne du PEG sur les souches bactériennes :***

### ***II.5.3. Pour E.C/ S.A***

L'évaluation de l'effet du PEG-3400 en milieu liquide sur les deux souches bactériennes, objet de notre étude, montre qu'après 24h d'incubation, tous les tubes présentent une turbidité visible à l'œil nu pour nos deux souches, sauf pour tube n° 1 de la souche S.A qui est clair car l'agent osmotique a favorisé la rétention d'eau (diminution de l'activité d'eau) dans S.A (voir figure n°14 /15). Ceci peut être expliqué par l'incapacité de notre polymère d'inhiber les souches bactériennes de façons efficace, ce qui confirme déjà les résultats déjà trouver sur support solide. Dans ces circonstances, la détermination de la CMI et par conséquent la CMB s'avère impossible.



**Figure n°14 :** Détermination de la CMI du PEG vis à vis SA.



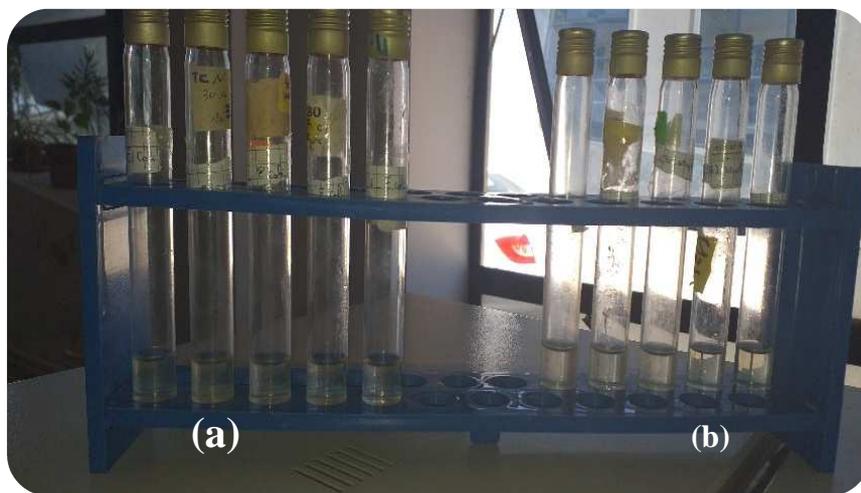
**Figure n° 15 :** Détermination de la CMI du PEG vis à vis EC.

Les résultats obtenus nous ont permis d'avoir une idée sur l'activité antibactérienne du PEG-3400 sur les souches choisies, et de penser à développer un protocole auxiliaire traitant l'effet synergique entre ce polymère et notre antibiotique (PEG /ABG).

## **II.6. Evaluation de l'effet synergique du composé (AB/PEG-3400) :**

### **II.6.1.: L'estimation de l'effet antibactérien du conjugué (PEG-3400/ABG)**

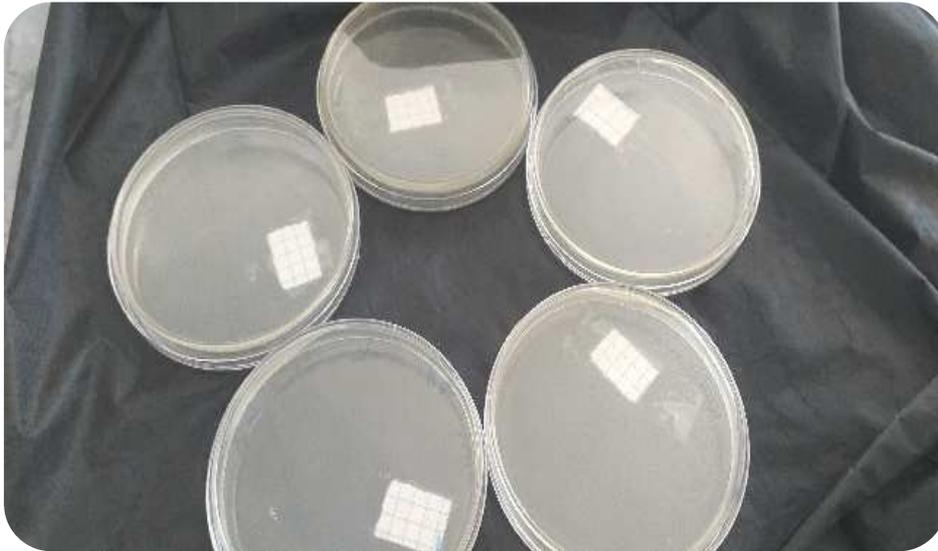
L'estimation de l'effet antibactérien du conjugué (PEG-3400/ABG) à différentes fractions molaires a révélé qu'après incubation de 24h, nous avons observé des tubes à essais totalement clairs et ceci pour les deux souches étudiées. Ceci signifie l'existence d'un effet bactériostatique totale des bactéries comme la montre la figure n°16.



**Figure n°16 :** Evaluation de l'effet synergique (PEG/antibiotique) sur milieu liquide pour les deux souches bactériennes, (a)SA, (b) EC.

### ***II.6.2.: l'examen en milieu solide des souches bactériennes sous l'effet du conjugué (PEG-3400/ABG)***

Après 24h d'incubation, l'examen en milieu solide des souches bactériennes sous l'effet du conjugué (PEG-3400/ABG) avec différentes fractions molaire, a révélé que tous les boîtes de pétries sont claires (aucune croissance bactérienne et ceci a été remarqué pour les deux souches *EC* et *SA* comme l'indique les figures n°17 et n°18. Ces résultats sont très prometteuses et montre l'existence d'un effet bactéricide total pour les deux souches bactériennes et pour les différentes proportions.



**Figure n°17 :** Evaluation de l'effet synergique du conjugué (PEG/antibiotique) sur milieu solide vis-à-vis EC.



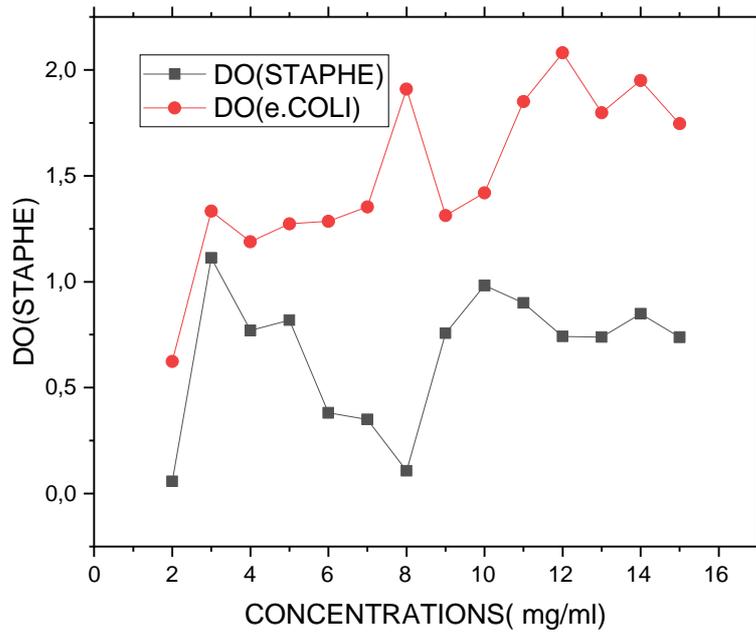
**Figure n°18 :** Evaluation de l'effet synergique du conjugué (PEG/antibiotique) sur milieu solide vis-à-vis SA.

## **II.7- Spectrophotométries :**

Pour chaque test en milieu liquides, tous les tubes à essais ont été soumis à l'examen par le spectrophotomètre UV-vis pour une longueur d'onde de 625nm, et ceci afin de déterminer la DO de chaque tube et avoir une idée sur la charge bactérienne dans chaque milieu (voir la figure n°19).

### **II.7.1- PEG-3400 :**

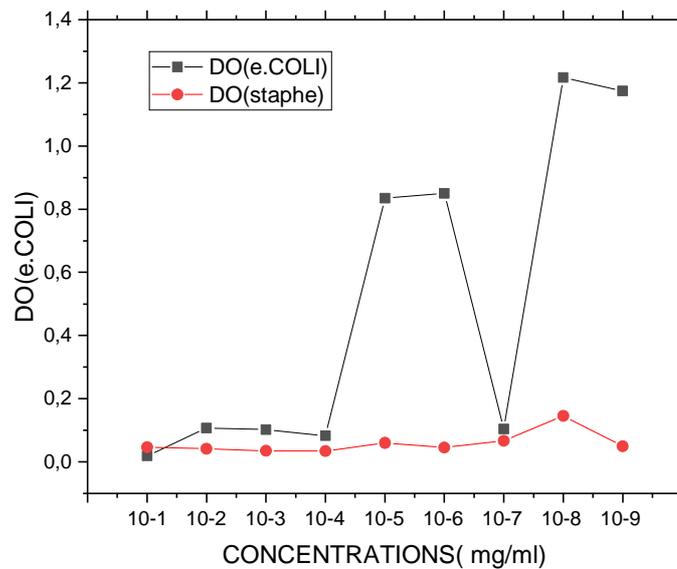
L'évolution de la densité optique des tubes à essais de la solution du PEG-3400 en fonction de leurs concentrations pour les deux souches *E.C* et *SA* est indiqué dans la figure n°19.



**Figure n°19:** Evolution de la densité optique (absorbance) en fonction de la concentration des deux souches E.C et SA soumises au (PEG 3400). (625nm)

### II.7.2 - Pour les dilutions d'antibiotique :

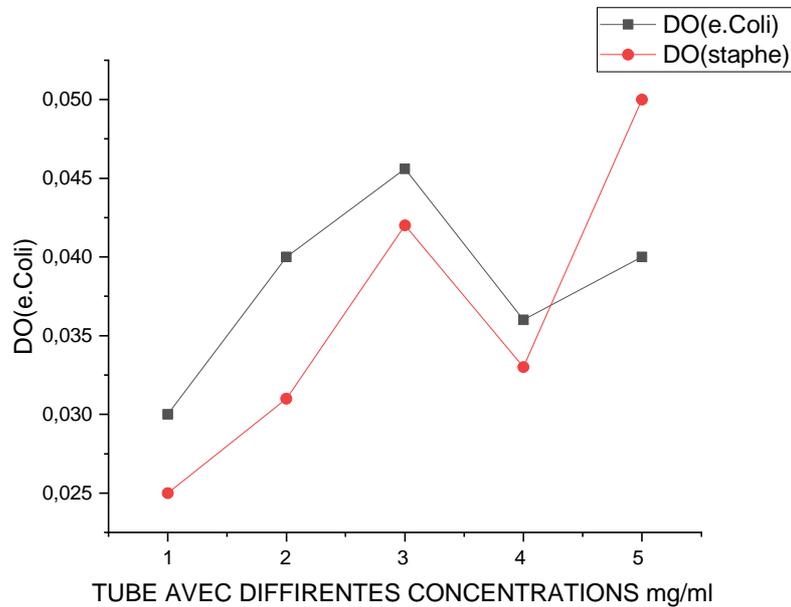
L'évolution de la densité optique des tubes à essais de la solution de l'ABG en fonction de leurs concentrations E pour les deux souches *E.C* et *SA* est indiqué dans la figure n°20.



**Figure n°20 :** Evolution de la densité optique (absorbance) en fonction de la concentration des deux souches E.C et SA soumises aux dilutions AB.

### II.7.3 Pour l'effet synergique PEG/ABG :

L'évolution de la densité optique des tubes à essais des solutions du conjugué PEG-3400/ABG en fonction de leurs fractions molaires pour les deux souches *E.C* et *S.A* est indiqué dans la figure n°21.



**Figure n°21:** Evolution de la densité optique (absorbance) en fonction de la concentration des deux souches *E.C* et *S.A* soumises à l'effet des conjugués (PEG 3400/ABG).

La spectrophotométrie est utilisée pour quantifier le nombre des germes en suspension (*E.C* / *S.A*) présente dans chaque solution. Lorsque les germes sont dans une suspension traversée par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée par la suspension est proportionnelle à la concentration des germes. La relation entre absorbance et concentration en germes est linéaire dans une gamme de concentrations couvrant environ un ordre de grandeur. En partant d'une suspension bactérienne de concentration connue (parlant de la solution mère),

Une gamme de dilution est réalisée et l'absorbance de chaque suspension est mesurée avec un spectrophotomètre.

Donc c'est une méthode quantitative de confirmation d'effet du PEG et ABG sur nos germes bactériens (*E.C* / *S.A*) dans chaque expérience précédente.

# **CONCLUSION**

A forte utilisation des antibiotiques dans le monde, l'apparition de bactéries résistantes à l'antibiotique est devenue un phénomène global et préoccupant. Pour éviter le pire, la communauté internationale, doivent trouver des composés alternatifs biodégradable comme pour notre cas le PEG-3400.

Donc, ce travail s'inscrit dans le cadre du développement des alternatifs des antibiotiques, pour cela on a utilisé un polymère qui est le PEG-3400 dont nous l'avons caractérisé par spectroscopie infrarouge et Raman.

Les résultats de caractérisation spectroscopique ont montré que notre produit est bien pur. L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'antibiotique (gentamicine) et du polyéthylène glycol (PEG-3400), réalisé dans ce présent travail, a été évaluée par la méthode de dilution en bouillon (Broth dilution method). Cette technique a révélé une CMI de la gentamicine de l'ordre de (4µg/ml) sur *EC* et (0.0004µg/ml) sur *SA*, ainsi une CMB de l'ordre de (0.4mg/ml) pour *EC* et *SA*.

L'évaluation de l'effet du PEG-3400 sur les deux souches étudiées a révélée qu'il y'a un effet d'inhibition très minime, ce qui rend la détermination de la CMI et par conséquent la CMB impossible.

L'évaluation de l'effet synergique (antibiotique/polymère) à différentes fractions molaires, à savoir 100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80, et à une concentration celle de la CMB trouvée pour la gentamicine (0,4mg/ml) a dévoilée que toutes les proportions ont inhibées totalement les deux souches bactériennes, ce qui revient à dire, que nous avons diminué la présence de la gentamicine de 80% pour la proportion (20/80). Ce résultat est très innovant, et ouvre une voie vers la réalisation des conjugués efficaces contre les différentes souches pathogènes.

Il est à signaler que certains points non traités dans notre étude et qui mériteraient d'être étudiés, on peut citer quelques un :

- ❖ Tout d'abord, il serait intéressant d'utiliser plusieurs types de PEG, comme PEG-200, PEG-400 et PEG-1000 pour voir l'effet du poids moléculaire sur lutte bactérienne.
- ❖ Il serait utile d'étudier aussi les mécanismes d'action du conjugué (ABG/PEG-3400) pour comprendre mieux ce qui se passe au niveau microscopique dans la lutte bactérienne.
- ❖ S'intéresser aux tests *in-vivo* du conjugué (ABG/PEG-3400) surtout celle de la
- ❖ Etudier l'effet synergique entre notre polymère et d'autres types d'antibiotiques.

**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

- (Greenwald, R. B. ., Choe, Y. H., McGuire, J. ., & Conover, C. D. (2003). *Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. Advanced drug delivery reviews. 55*, 217-250.
- .Bambeke, V. (2008). Pharmacologie et pharmacothérapie anti infectieuse [en ligne]. In *Université catholique de Louvain*.
- .Barbillat, J. ., Bougeard, D. ., Buntinx, G. ., Delhaye, M. ., & Dhameincourt, P. (1999). *Spectrophotométrie Raman. Tech. L'ingénieur -Mes. -Anal.*
- .Denis, F. ., Cattoir, V. ., Martin, C. ., Ploy, M. C. ., & Poyart, C. (2007). *Bactériologie médicale Techniques usuelles, Edi III : Masson ; 19*.
- .Duncan, R. (2003). [Duncan, R. *The dawning era of polymer therapeutics. Nat. Rev. Drug Discov.*2, 347–60.
- .Frankel, Gad, Ron, E. Z. (Eds. . (2018). *Escherchia coli, un Pathogène polyvalent* (E. Z. (Eds. . Frankel, Gad, Ron (éd.); SPRINGER).
- .Jourdain, M. (2016). *Complémentarités de la spectroscopie Infrarouge et Raman*.
- .Nalawade, T., Sogi, S. P., & Bhat, K. (2015). Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 5(2), 114. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.155736>
- .National Committee for Clinical Laboratory Standards, & Barry, A. L. (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. 19*(18).
- .Oussou, K. R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Dosso, M., N'Guessan, Y. T., ... & Koukoua, G. (2004). *Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. 7*.
- .Pasquier, C., Grosjean, J., Clavé, D., & Archambaud, M. (2017). *Bactériologie et virologie pratique* (De Boeck S).
- .Paun, I. A. ., Ion, V. ., Moldovan, A. ., & Dinescu, M. (2010). « Thin films of polymer blends deposited by matrix-assisted pulsed laser evaporation: Effects of blending ratios », *Applied Surface Science* 257, 5259–5264.]. *Applied Physics Letters*, 96.
- .Peng, L., Chang, L., Liu, X., Lin, J., Liu, H., Han, B., & Wang, S. (2017). *Antibacterial Property of a Polyethylene Glycol-Grafted Dental Material*. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05284>
- .Schaechter, M., Medoff, G. ., & Eisenstein, B. I. (1999). *Microbiologie et Pathologie Infectieuse* (R. D. E. A. P. P. D. J.-P. F. MARC VICTOR ASSOUS, ANNE-LISE BASSE-GUÉRINEAU , HERVÉ BOURHY (éd.); de boeck s). pollina.
- .Siegenthaler, W. E. ., Bonetti, A. ., & Luthy, R. (1986). . *Arininoglycoside antibiotics in infectious diseases. 80*.
- .Wei, X. ., Jie, D. ., Cuello, J. J. ., Johnson, D. J. ., Qiu, Z. ., & He, Y. (2014). *Microalgal detection by Raman microspectroscopy*.

# **ANNEXES**

## Annexe N° 1

Classification des différentes souches bactériennes testées *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Division Proteobacteria	Division Firmicutes
Espèce E.C	Espèce Staphylococcus aureus
Règne Bacteria	Règne Bacteria
Embranchement Proteobacteria	
Classe Gamma Proteobacteria	Classe Bacilli
Ordre Enterobacteriales	Ordre Bacillales
Famille Enterobacteriaceae	Famille Staphylococcaceae

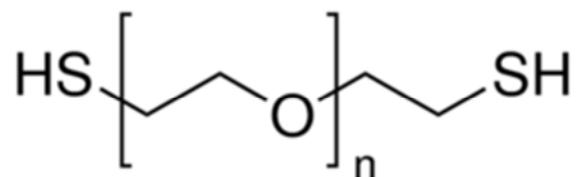
**Annexe n° 02****Composition gélose Mueller-Hinton (MH)**

Hydrolysat acide de caséine (peptone)	17,5 g
Extrait de viande	2,0 g
Amidon	1,5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12,5 mg
Agar	15,0 g
pH = 7,4 +/- 0,2	
Eau distillée	qsp 1

**N.B :** Pour le MH en bouillon c'est la même composition, juste il contient pas de l'agar.

**Annexe N° 03**

PEG 3400 :



Formule PEG 3400

Catégories apparentées :

- mol wt average  $M_n$  3,400
- reaction suitability

reagent type: cross-linking reagent

reactivity: thiol reactive

- mp

58-65 °C

- $\Omega$ -end

thiol

- $\alpha$ -end

thiol

- polymer architecture

shape: linear

functionality: homobifunctional

- storage temp.

## Résumé :

L'accroissement rapide de l'apparition de résistances contre les antibiotiques utilisés dans le traitement des infections bactériennes est une menace grave pour la santé publique. Ce phénomène nuit à l'efficacité des traitements ce qui a pour effet d'aggraver les symptômes et d'augmenter les risques de mortalité liées à ces infections. Notre travail a pour objectif d'évaluer l'effet antibactérien du polyéthylène glycol (PEG), qui est une macromolécule issue de la polymérisation d'unités d'oxyde d'éthylène. Après une caractérisation du polymère par spectroscopie infra rouge et Raman; son activité antibactérienne a été testée sur deux souches bactériennes une de Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*Escherichia coli*). Différentes concentrations du PEG ont été préparées (de 0,002 g/ml à 2 g/ml) pour déterminer la CMI et CMB. Un antibiotique a été utilisé comme témoin positif et aussi il a été associé avec le PEG afin d'investiguer leur effet synergétique. Les résultats ont montré que la quasi-totalité des modes de vibrations prédit théoriquement sont présents dans les deux spectres (expérimentale et calculé). La lecture des cultures a révélé des petites zones d'inhibitions pour les deux bactéries *E.C* et *S.A* indiquant un effet non remarquable de PEG sur ces souches. Par contre, l'effet synergétique de la combinaison a montré un pouvoir bactéricide total sur les deux souches et pour les différentes proportions testées.

**Mots clés :** Polyéthylène glycol, effet antibactérien, effet synergétique, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

---

## ملخص :

تشكل الزيادة السريعة في ظهور المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة في علاج الالتهابات البكتيرية تهديداً خطيراً للصحة العامة. هذه الظاهرة مضرّة بفاعلية العلاجات ، مما يؤدي إلى تفاقم الأعراض وزيادة خطر الوفيات المرتبطة بهذه العدوى. يهدف عملنا إلى تقييم التأثير المضاد للبكتيريا لبولي إيثيلين جلايكول (PEG) ، وهو جزيء ضخم ينتج عن بلمرة وحدات أكسيد الإيثيلين. بعد توصيف البوليمر بواسطة مطيافية الأشعة تحت الحمراء ورامان ؛ تم اختبار نشاطه المضاد للبكتيريا على سلالتين من البكتيريا ، واحدة إيجابية الجرام (*Staphylococcus aureus*) وسلبية الجرام

(Escherichia coli). تم تحضير تركيزات مختلفة من ( 0.002 مغ / مل إلى 2 مغ / مل) لتحديد التركيز الأدنى للتثبيط و التركيز الأدنى للإبادة. تم استخدام المضاد الحيوي كشاهد إيجابي ، كما تم دمجه مع البوليمر للتحقق من تأثيرهما التآزري. أظهرت النتائج أن جميع أوضاع الاهتزاز المتوقعة نظريًا موجودة في كل من الأطياف (التجريبية والمحسوبة). كشفت قراءة النتائج عن وجود مناطق صغيرة من التثبيط لكل من بكتيريا *E.C* و *S.A* مما يشير إلى وجود تأثير غير ملحوظ ل البوليمر على هذه السلالات. من ناحية أخرى ، أظهر التأثير التآزري للمجموعة قوة مطلقة كمبيد للجراثيم على السلالتين وللنسب المختلفة التي تم اختبارها .

الكلمات المفتاحية: بولي إيثيلين جلايكول ، تأثير مضاد للجراثيم، تأثير تآزري،

---

## Abstract

The rapid increase in the emergence of resistance to antibiotics used in the treatment of bacterial infections is a serious threat to public health. This phenomenon is detrimental to the effectiveness of treatments, which has the effect of worsening the symptoms and increasing the risk of mortality associated with these infections. Our work aims to assess the antibacterial effect of polyethylene glycol (PEG), which is a macromolecule produced by the polymerization of ethylene oxide units. After characterization of the polymer by infrared spectroscopy and Raman; its antibacterial activity was tested on two bacterial strains, one of Gram positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli*). Different concentrations of PEG were prepared (from 0.002 g / ml to 2 g / ml) to determine MIC and CMB. An antibiotic was used as a positive control and also it was combined with PEG to investigate their synergistic effect. The results showed that almost all of the theoretically predicted vibration modes are present in both spectra (experimental and calculated). Reading the cultures revealed small areas of inhibition for both *E. coli* and *S.A* bacteria indicating an unremarkable effect of PEG on these strains. On the other hand, the synergistic effect of the combination showed a total bactericidal power on the two strains and for the different proportions tested.

Key words: Polyethylene glycol, antibacterial effect, synergistic effect, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*